

Untersuchungen zur zellulären Immunantwort
nach Impfung gegen das Hepatitis B-Virus



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III -Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Tanja Bauer

aus Aicha vorm Wald

Februar 2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 6. Februar 2002
Datum der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2002
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. C. Aslanidis

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Heinze
Erstgutachter:	Prof. Dr. C. Aslanidis
Zweitgutachter:	Prof. Dr. W. Jilg
Drittprüfer:	Prof. Dr. A. Kurtz

Inhalt

INHALT	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Entdeckung des Hepatitis B-Virus	1
1.2 Systematik des Hepatitis B-Virus	2
1.2.1 Taxonomie	2
1.2.2 Serotypen und Genotypen	4
1.3 Morphologie der viralen Partikel	6
1.3.1 Das Virion	6
1.3.2 Subvirale Partikel	8
1.4 Organisation des HBV-Genoms	8
1.4.1 Genomstruktur	8
1.4.2 Genomorganisation	9
1.4.3 Expression der viralen Proteine	11
1.5 Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus	17
1.5.1 Infektion der Zielzelle	18
1.5.2 Kerntransport und Bildung der cccDNA	19
1.5.3 Transkription und Translation	19
1.5.4 Bildung des viralen Nukleokapsids und Partikelreifung	21
1.5.5 Replikation	22
1.6 Epidemiologie der Hepatitis B	23
1.6.1 Übertragungsweg	23
1.6.2 Verbreitung	24
1.7 Klinik und Diagnostik der Hepatitis B-Infektion	25
1.7.1 Klinik	25
1.7.2 Diagnostik	26
1.8 Immunprophylaxe der Hepatitis B	27
1.8.1 Passive Immunisierung	28
1.8.2 Aktive Immunisierung	29
1.8.3 Entwicklung neuer HBV-Vakzinen	30
1.9 Immunologische Kontrolle der HBV-Infektion	30
1.9.1 HBV-Immunpathogenese	30
1.9.2 Humorale Immunantwort nach HBV-Infektion	31
1.9.3 Zelluläre Immunantwort nach HBV-Infektion	32

1.10 Varianten des Hepatitis B-Virus und ihre Rolle in der Immun-pathogenese	36
1.10.1 Natürlich auftretende Virus-Varianten	36
1.11 Ziel der Arbeit	39
2. MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Material	41
2.1.1 Probanden-Kollektiv	41
2.1.2 Zelllinien	41
2.1.3 Antigene und Mitogene	41
2.1.4 Antikörper zur Untersuchung der HLA-Restriktion	42
2.1.5 Synthetische Peptide	42
2.1.6 Datenbanken	48
2.2 Methoden	49
2.2.1 Zellkulturtechniken	49
2.2.2 Arbeiten mit peripheren Blutlymphozyten (PBL)	51
2.2.3 Immunologische Nachweismethoden	53
2.2.4 Arbeiten mit DNA	59
2.2.5 Arbeiten mit primären humanen Hepatozyten	62
3. ERGEBNISSE	65
3.1 Immunologische Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung	65
3.1.1 Abhängigkeit der T-Zellreaktivität von der Antigendosis	65
3.1.2 Proliferation HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten	67
3.1.3 Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort	70
3.1.4 Überprüfung der MHC-Restriktion der HBsAg-Präsentation	70
3.1.5 Charakterisierung HBsAg-spezifischer T-Helferzellen anhand ihrer Zytokinsekretion	73
3.1.6 Identifizierung weiterer CD4 ⁺ -T-Zell-Epitope	78
3.1.7 CTL-Epitope	78
3.1.8 Zusammenfassung	79
3.2 Einfluß von IFN-γ und TNF-α auf die Virusreplikation in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten	80
3.2.1 <i>In vitro</i> -Infektionsmodell für primäre humane Hepatozyten	80
3.2.2 Wirkung von Th1-Zytokinen auf die <i>in vitro</i> -Infektion von PHH	82
3.2.3 Zusammenfassung	88
3.3 Einfluß von Aminosäureaustauschen in T-Helferzell-Epitopen des HBsAg auf ihre stimulatorische Kapazität	89
3.3.1 Variabilität von T-Helferzell-Epitopen des HBsAg	89
3.3.2 Natürlich auftretende Varianten der Epitope P1wt und P4wt	90
3.3.3 Einfluß der Epitopvarianten auf die Proliferation HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten	91
3.3.4 Dosisabhängigkeit der stimulatorischen Kapazität der P1wt- und P4wt-Epitop-Varianten	97

3.3.5 Zytokinsekretion HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit P1wt- und P4wt-Varianten	100
3.3.6 Charakterisierung der Aminosäureaustausche der untersuchten Epitop-Varianten	105
3.3.7 Charakterisierung der MHC Klasse II-Restriktion der Epitope P1wt und P4wt	111
3.3.8 Einfluß der T-Helferzellen auf die <i>in vitro</i> anti-HBs-Produktion	114
3.3.9 Zusammenfassung	116
4. DISKUSSION	117
4.1 Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Hepatitis B-Impfung	117
4.2 Vorhersage von T-Zell-Epitopen aufgrund bekannter Bindungsmotive	121
4.3 Rolle der Th1-Zytokine bei der Infektion humaner Hepatozyten	123
4.4 Reaktivität spezifischer T-Helferzellen gegenüber Varianten des HBsAg	125
4.4.1. Variabilität des Hepatitis B-Oberflächenantigens	126
4.4.2. Einfluß von Aminosäureaustauschen innerhalb spezifischer T-Helferzell-Epitope auf deren stimulatorische Kapazität	126
4.5 Stellen T-Helferzell-Epitope mit veränderter Immunogenität eine Gefahr für die Wirksamkeit der HBV-Vakzine dar?	129
5. LITERATUR	132
6. ANHANG	145
Abkürzungsverzeichnis	145
Veröffentlichte Arbeiten	147
Danksagung	149

Zusammenfassung

Für die Prophylaxe einer Hepatitis B-Infektion steht mit der rekombinanten HBV-Vakzine ein effizientes Mittel für die aktive Immunisierung zur Verfügung. Der Impfschutz wird dabei durch neutralisierende Antikörper vermittelt, die gegen das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), die wirksame Komponente der Vakzine, gerichtet sind. Eine effektive humorale Immunantwort erfordert jedoch auch das Vorhandensein von zellulären Mechanismen, wie sie in Form von HBsAg-spezifischen T-Helferzellen induziert werden. Die hier vorliegende Arbeit untersucht daher die zelluläre Immunantwort nach Hepatitis B-Impfung und geht speziell auf die Erkennung natürlich auftretender Virus-Varianten des HBsAg durch die impfinduzierten spezifischen T-Helferzellen ein.

Es konnte gezeigt werden, daß bei einem Großteil der geimpften Probanden eine protektive Antikörperantwort von einer starken T-Zellantwort gegen unterschiedliche Epitope des HBsAg begleitet wird. Diese, ausschließlich MHC Klasse II-restringierte T-Zellantwort wurde bei der Mehrheit der untersuchten Probanden durch zwei der in der Literatur beschriebenen vier T-Zell-Epitope vermittelt. Die reaktiven T-Zellen gehören unseren Ergebnissen zufolge im wesentlichen der Gruppe der Th1-Zellen an, die durch die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und TNF- α gekennzeichnet ist. In einem Modellsystem, das die Untersuchung der HBV-Infektion *in vitro* am Beispiel von primären humanen Hepatozyten ermöglicht, konnten wir zeigen, daß diese Zytokine die Virusreplikation entscheidend beeinflussen können.

Bezogen auf zwei der vier bekannten immunogenen Bereiche, die für die zelluläre Immunantwort verantwortlich sind, zeigte die Analyse des bis *dato* verfügbaren HBsAg-Sequenzmaterials eine Reihe von Aminosäureaustauschen.

Peptide, die diese natürlichen Epitop-Varianten repräsentieren, wurden in vergleichenden immunologischen Studien auf ihre Fähigkeit untersucht, impfinduzierte T-Helferzellen zu aktivieren. Dabei zeigte sich, daß sechs der 23 getesteten Mutationen zu einem Verlust der T-Helferzell-Reaktivität führen. Dieses

Phänomen war gekennzeichnet durch das Fehlen der proliferativen T-Zellantwort, die Beeinträchtigung der T-Zell-spezifischen Zytokinsekretion und die Reduktion der anti-HBs-Produktion *in vitro*. Überraschenderweise wurde dies jedoch nur bei einem Teil der geimpften Probanden beobachtet, wohingegen sich bei der Mehrheit der untersuchten Probanden im Kontext dieser Epitop-Varianten keine signifikanten Unterschiede in der Reaktivität HBsAg-spezifischer T-Helferzellen zeigten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen somit erstmals die Existenz von natürlich auftretenden HBsAg-Varianten, deren veränderte Epitope nicht von impfinduzierten T-Helferzellen einzelner Probanden erkannt werden. Die hohe natürliche Mutationsrate des Hepatitis B-Virus führt zur Entstehung ständig neuer Varianten. Aufgrund dessen ist es von größter Bedeutung, das Auftreten derartiger HBsAg-Mutationen sorgfältig zu beobachten, um auszuschließen, daß diese gegebenenfalls den impfinduzierten Schutz unterlaufen können.

.

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung des Hepatitis B-Virus

Der Begriff der Hepatitis ist bezeichnend für ein Krankheitsbild, bei dem als Folge einer entzündlichen Reaktion primär die Leber betroffen ist, und andere Organe nur sekundär in Mitleidenschaft gezogen werden. Hepatitiden können dabei durch unterschiedliche Auslöser wie etwa toxische Agentien (z. B. Medikamente), durch Autoimmunreaktionen, am häufigsten jedoch durch infektiöse Agentien hervorgerufen werden. Letztere beinhalten eine breite Palette an Erregern, wie etwa Bakterien (z. B. Leptospiren), Protozoen (z. B. Amöben) oder Viren. Die verschiedenen Formen der Virushepatitis sind weltweit verbreitet und gehören neben exanthemischen und respiratorischen Viruserkrankungen mit zu den häufigsten viralen Erkrankungen. Im Gegensatz zu Vertretern der Herpesvirusfamilie, die ebenfalls die Ursache einer Hepatitis sein können, handelt es sich bei den eigentlichen Hepatitis-Viren um Viren, die sich durch ihren speziellen Hepatotropismus auszeichnen.

Der Ikterus als Symptom einer Lebererkrankung fand bereits früh Erwähnung in geschichtlichen Aufzeichnungen (Lyons, 1978; Hollinger, 1996). Die erste detaillierte Beschreibung einer Hepatitis B-Epidemie und des zu diesem Zeitpunkt vermuteten parenteralen Übertragungsweges erfolgte 1883, als im Rahmen einer Pockenschutzimpfung bei etwa 15 % der Geimpften Symptome einer Lebererkrankung auftraten (Lürmann, 1885). Weitere Fallbeschreibungen von Posttransfusions- und Postvakzinationshepatitiden sowie Berichte über Fälle nosokomialer Übertragung wiesen zunehmend auf den postulierten, parenteralen Inokulationsweg hin (Fox *et al.*, 1942; Findley *et al.*, 1944; MacCallum und Bradley, 1944; Hughes, 1946).

Die Bezeichnung Hepatitis B (MacCallum, 1947) bzw. Serum-Hepatitis (Bradley, 1946) grenzte diese Form der Hepatitis von der fäkal-oral übertragbaren Form, der Hepatitis A, ab.

Die Identifizierung und Charakterisierung des Hepatitis B-Virus wurde jedoch lange Zeit durch dessen extreme Spezies- und Zelltypspezifität und des daraus resultierenden, fehlenden Zellkultur- bzw. Tiermodells erschwert.

1965 war es der Ethnologe Blumberg, der im Rahmen anthropologischer Studien zur Identifizierung geographisch bedingter Polymorphismen im Serum eines australischen Ureinwohners durch Immunpräzipitation ein bis *dato* unbekanntes Antigen entdeckte (Blumberg, 1965). Nach seiner Herkunft benannte Blumberg dieses Antigen „Australia Antigen“ (AuAg). Nachfolgende Studien zeigten, daß dieses AuAg in den unterschiedlichsten Populationen zu finden war und gehäuft bei Empfängern von Blutprodukten auftauchte. Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein dieses Antigens und einer Hepatitis B-Infektion konnte im Folgenden durch eine Reihe von Studien bestätigt werden (Blumberg, 1967; Prince, 1968; Okochi und Murakami, 1968). Da jedoch elektronenmikroskopische Untersuchungen dieses AuAg hauptsächlich auf der Oberfläche subviraler Partikel lokalisierten, diese Partikel jedoch keinerlei Nukleinsäure enthielten, blieb die Frage nach dem eigentlichen infektiösen Agens weiter unklar. 1970 gelang es Dane, die wesentlich selteneren 42 nm-Viruspartikel (Dane-Partikel) zu identifizieren, die neben dem AuAg auf ihrer Oberfläche zusätzlich ein Kapsid mit darin enthaltener Nukleinsäure aufwiesen (Dane, 1970). Die Lokalisierung des AuAg auf der Oberfläche des Hepatitis B-Virus führte schließlich zur Bezeichnung Hepatitis B-Oberflächenantigen (*Hepatitis B surface antigen*, HBsAg).

1.2 Systematik des Hepatitis B-Virus

1.2.1 Taxonomie

Die grundlegendste Eigenschaft, die zur Einordnung des Hepatitis B-Virus herangezogen wird, ist die Replikation des viralen Genoms mit Hilfe eines reversen Transkriptaseschrittes. Die Gemeinsamkeit der Reversen Transkriptase-Aktivität führte zu der Annahme einer phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Hepadna-

(hepatotrophe DNA-Viren), Caulimo- und Retroviren. Somit ist das Hepatitis B-Virus zusammen mit anderen Viren, die über eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verfügen, der Gattung der Retroviren zuzuordnen. Im Gegensatz zu den Orthoretroviren, bei deren Lebenszyklus die Integration proviraler DNA einen obligatorischen Schritt darstellt, ist dies bei den DNA-Viren unter den Retroviren ein fakultativer Prozess. Aus diesem Grund erfolgt die Zuordnung des Hepatitis B-Virus zu den Pararetroviren.

Charakteristische Gemeinsamkeiten der Hepadnaviren sind neben der Reversen-Transkriptase-Aktivität die hohe Spezies- und Zelltyp-Spezifität, die weitgehend konservierte Genomorganisation, die extreme Überexpression unterschiedlicher Strukturproteine sowie der parenterale Übertragungsweg.

Grundsätzlich werden die Hepadnaviren der Säugetiere (Genus Orthohepadnavirus) von denen der Vögel (Genus Avihepadnavirus) aufgrund der Unterschiede in der Genomorganisation getrennt (Tab. 1-1); Avihepadnaviren weisen nur drei offene Leseraster auf, da ihnen das allen Orthohepadnaviren gemeinsame HBx-Gen fehlt.

Tabelle 1-1: Übersicht derzeit bekannter Hepadnaviren

Orthohepadnavirus	Spezies	Erstbeschreibung
Hepatitis B-Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>	Dane <i>et al.</i> , 1970
Chimpanzee Hepatitis B-Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>	Vaudin <i>et al.</i> , 1988
Gibbon Hepatitis B-Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>	Norder <i>et al.</i> , 1996
Orang Utan Hepatitis B-Virus (OuHBV)	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>	Warren <i>et al.</i> , 1999
Gorilla Hepatitis B-Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	Grethe <i>et al.</i> , 2000
Woolly Monkey Hepatitis B-Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>	Lanford <i>et al.</i> , 1998
Woodchuck Hepatitis-Virus (WHV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>	Summers <i>et al.</i> , 1978
Ground squirrel Hepatitis-Virus (GSHV)	Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>	Marion <i>et al.</i> , 1982
Arctic Ground squirrel Hepatitis-Virus (AGSHV)	Arktisches Erdhörnchen <i>Spermophilus parryi</i>	Testut <i>et al.</i> , 1996

Avihepadnavirus	Spezies	Erstbeschreibung
Duck Hepatitis B-Virus (DHBV)	Stock-Ente <i>Anas domesticus</i>	Mason <i>et al.</i> , 1980
Heron Hepatitis-Virus (HHV)	Graureiher <i>Adrea cinerea</i>	Feitelson <i>et al.</i> , 1986
Ross Goose Hepatitis B-Virus (RGHBV)	Ross-Gans <i>Anser rossi</i>	Testut <i>et al.</i> , 1996
Snow Goose Hepatitis B-Virus (SGHBV)	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>	Chang <i>et al.</i> , 1999
Maned Duck Hepatitis B-Virus (MDHBV)	Mähnenente <i>Chenonetta jubata</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
Grey Teal Hepatitis B-Virus (GTHBV)	Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
Stork Hepatitis B-Virus (STHBV)	Weißstorch <i>Ciconia ciconia</i>	Pult <i>et al.</i> , 2001

1.2.2 Serotypen und Genotypen

Die Unterscheidung zwischen den serologischen Subtypen des Hepatitis B-Virus ist auf Aminosäureaustausche in der s-Domäne der Hüllproteine zurückzuführen. Das HBsAg enthält im Bereich der Aminosäuren 101-168 weitgehend hydrophile Aminosäuren, die an der Oberfläche der Virionen exponiert vorliegen und deren Antigenität bestimmen. Allen bislang untersuchten Isolaten gemeinsam ist dabei ein Abschnitt, der als a-Determinante bezeichnet wird. Daneben existieren weitere allelisch auftretende Subtyp-Determinanten [*d* oder *y* und *w* (*w1-w4*) oder *r*], wobei *r* und *w4* noch durch *q*^{+/−} ergänzt werden können (Peterson *et al.*, 1984). Die Subtyp-Determinanten *d* und *y* sowie *r* und *w* verhalten sich dabei wie Allelpaaire, so daß jedes Virus in der Regel zusätzlich zur a-Determinante zwei Subtyp-Determinanten besitzt (Bancroft *et al.*, 1972). Ein Austausch an Position 122 (Lys → Arg) verursacht eine Verschiebung von *d* nach *y*, ein Wechsel an Position 160 (Arg → Lys) führt zum Subtypwechsel von *r* nach *w* (Peterson *et al.*, 1984). Die zusätzliche Unterteilung der *w*-Determinante beruht auf der variabel besetzten Position 127 (Norder *et al.*, 1993). Ein anderweitiger Austausch dieser basischen Aminosäuren führt zum vollständigen Verlust der Subtypdeterminanten (Ashton und Murray, 1989; Okamoto *et al.*, 1988).

Zusätzliche Determinanten wie *i* und *t* (¹²⁶Ile bzw. ¹²⁶Thr) können unabhängig von *d/y* oder *w/r* auftreten (Ohnuma *et al.*, 1993), haben jedoch in der Praxis eine untergeordnete Bedeutung.

Eine neuere Klassifizierung der Hepatitis B-Viren unterscheidet zwischen mittlerweile sieben Genotypen, die mit A-G bezeichnet werden, wobei sich die einzelnen Gruppen durch eine Sequenzdivergenz von mindestens 8 % unterscheiden, während die Differenzen innerhalb der Genotypen durchschnittlich bei 4-5 % liegen (Norder *et al.*, 1994; Naumann *et al.*, 1993; Styver *et al.*, 2000). Eine Korrelation zwischen Geno- und Serotypisierung ist dabei nicht vorhanden.

1.3 Morphologie der viralen Partikel

Neben den eigentlich infektiösen Partikeln des Hepatitis B-Virus, als Dane- oder 42 nm-Partikel bezeichnet, findet man bei akut oder chronisch infizierten Personen zwei weitere Spezies von Partikeln (Abb. 1-1). Es handelt sich dabei um subvirale, nicht-infektiöse Formen, die analog zur Virushülle aus dem Oberflächenantigen sowie zellulären Lipidkomponenten aufgebaut sind.

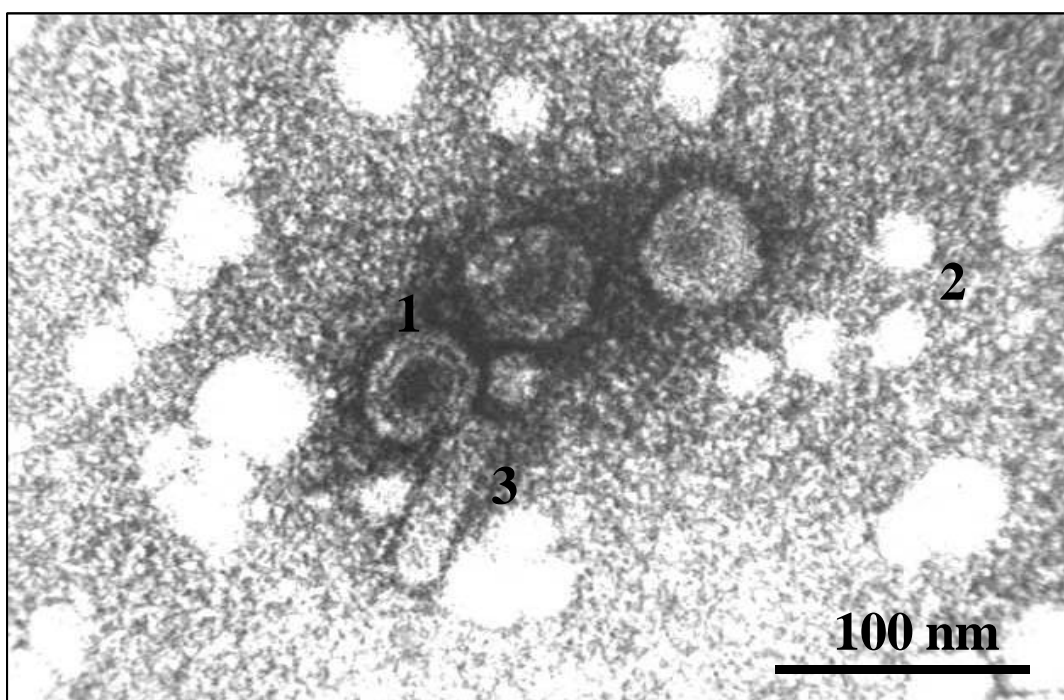


Abbildung 1-1: HBV-assoziierte Partikel.

Elektronenmikroskopische Aufnahme HBV-assoziiierter Partikel im Serum eines chronischen Virusträgers. 1: Dane-Partikel; 2: sphärische 22 nm-Partikel; 3: filamentöse Partikel (Weinberger, 2000).

1.3.1 Das Virion

Das Hepatitis B-Virus, eines der kleinsten umhüllten Viren mit einem Durchmesser von 42 nm, erscheint im Elektronenmikroskop als doppelschaliges, nahezu perfekt kugeliges Gebilde (Abb. 1-1). In die Lipidhülle des Viruspartikels sind etwa 240 Kopien des Oberflächenproteins (HBsAg) eingelagert, welches in drei

unterschiedlichen Ausprägungen auftritt, als großes (*large*, lHBsAg), mittleres (*middle*, mHBsAg) und kleines HBsAg (*small*, sHBsAg). Diese Lipidhülle umgibt das ikosaedrische Kapsid des Hepatitis B-Virus mit einem Durchmesser von 28-34 nm. Das Kapsid (sog. *core*-Partikel) wird aus dimerisierten Vorläufern des Kapsid-Proteins (Hepatitis B-*core*-Antigen, HBcAg) zusammengesetzt (Zhou *et al.*, 1992). Man findet zwei Kapsidformen, die je nach Aufbau aus 90 oder 120 *core*-Dimeren, ein Ikosaeder mit T= 3- bzw. T= 4-Symmetrie repräsentieren (Crowther *et al.*, 1994). Das Kapsid umschließt neben der Nukleinsäure auch die am 5'-Ende des Minusstranges kovalent gebundene virale Polymerase sowie die zelluläre Proteinkinase C (Abb. 1-2).

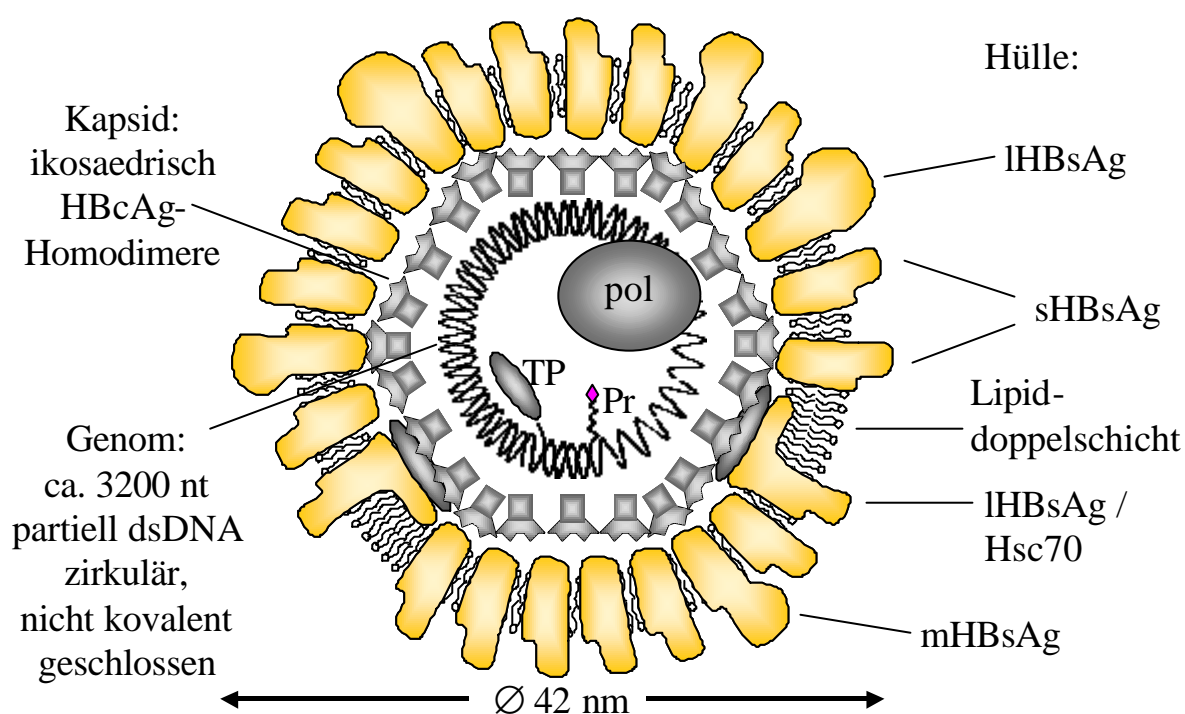


Abbildung 1-2: Schematisches Modell des Hepatitis B-Virions.

lHBsAg: großes HBsAg; mHBsAg: mittleres HBsAg; sHBsAg: kleines HBsAg; pol: Reverse Transkriptase- und RNase H-Domäne der Polymerase; TP: Primase-Domäne der Polymerase sog. terminales Protein; Pr: 18 Nukleotide langer Oligoribonukleotidprimer, kovalent an das 5'-Ende des Plusstranges gebunden (modifiziert, nach Weinberger, 2000).

1.3.2 Subvirale Partikel

Neben den infektiösen Partikeln finden sich im Blut HBV-infizierter Patienten auch zwei weitere morphologisch gut unterscheidbare Formen nicht-infektiöser Partikel (Abb. 1-3; Bayer *et al.*, 1968; Almeida, 1972).

Die häufigste Spezies sind sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 22 nm, die fast ausschließlich aus sHBsAg bestehen. Diese Partikel können im Serum chronischer Virusträger eine Konzentration von bis zu 10^{13} Partikel/ml erreichen. Die zweite Form sind filamentöse Partikel variabler Länge (bis zu 10^{11} Partikel/ml Blut), die alle drei Arten von Hüllproteinen enthalten, wobei jedoch wiederum das sHBsAg dominiert (Kann und Gerlich, 1998).

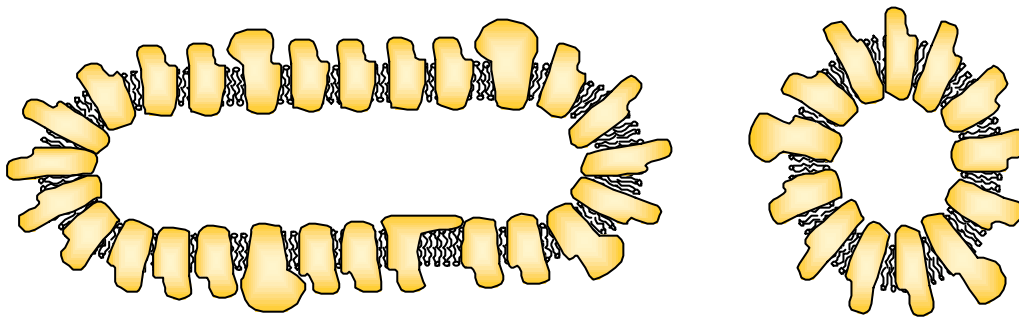


Abbildung 1-3: Subvirale Partikel des Hepatitis B-Virus.

Beide Partikelformen haben einen Durchmesser von 22 nm und liegen in filamentöser (links) oder sphärischer (rechts) Form vor. Charakteristisch für filamentöse Partikel ist ihre variable Länge von 50-300 nm (modifiziert nach Weinberger, 2000).

1.4 Organisation des HBV-Genoms

1.4.1 Genomstruktur

Das Hepatitis B-Virus besitzt eines der kleinsten Genome aller bekannten Viren, wobei sich die einzelnen Genotypen in ihrer Genomlänge (3182-3248 nt) nur

geringfügig voneinander unterscheiden (Magnius und Norder, 1995; Styver *et al.*, 2000). Die geringe Größe wird durch eine sehr komplexe Anordnung der einzelnen Gene kompensiert, die sich in verschiedenen Leserahmen über die halbe Länge des Genoms überlappen (Abb. 1-4). Die Nukleinsäure der infektiösen Virionen besteht aus zirkulärer, partiell doppelsträngiger DNA, wobei der kodierende Minusstrang intakt ist, während der Plusstrang mit einer variablen Länge von 1100 bis 2600 nt unvollständig in den Virionen vorliegt (Robinson *et al.*, 1974; Summers *et al.*, 1975; Landers *et al.*, 1977). Die beiden Enden des Minusstranges überlappen im Bereich des 5'-Endes um 8-10 nt (terminale Redundanz). Somit liegt in diesem Bereich das Genom dreisträngig vor (Will *et al.*, 1987), wobei das 5'-Ende des Minustranges kovalent an die Primer-Domäne der viralen Polymerase gebunden ist.

Der Plusstrang hat ein definiertes 5'-Ende, welches etwa 230 nt vor der Zirkularisierungsstelle liegt. An dieses 5'-Ende ist ein 18 nt langes Oligoribonukleotid kovalent gebunden, das eine mRNA-ähnliche *Cap*-Struktur aufweist und als Primer für die Synthese des Plusstranges fungiert. Dieses stellt das eigentliche 5'-Ende der prägenomischen RNA dar, welches von der RNase H-Domäne der Polymerase nicht abgebaut wird (Lien *et al.*, 1986; Will *et al.*, 1987; Loeb *et al.*, 1991).

Weiterhin enthält das Genom im Bereich der beiden 5'-Termini zwei 11 Basenpaare umfassende Sequenzwiederholungen (*direct repeats*, DR1 und DR2), die eine entscheidende Rolle bei der Replikation spielen (Will *et al.*, 1987). Die beiden Enden des Minusstranges liegen dabei im Bereich von DR1, während DR2 den Beginn des Plusstranges kennzeichnet (Molnar-Kimber *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1986; Lien *et al.*, 1987; Will *et al.*, 1987).

1.4.2 Genomorganisation

Das Genom der Orthohepadnaviren enthält auf dem Minusstrang vier konservierte, teilweise überlappende offene Leserahmen [S- (*surface*), C- (*core*), P- (Polymerase) und X-Bereich; Abb. 1-4], wobei die C- und S- Leserahmen aufgrund differentieller Translationsstarts für mehrere Proteine kodieren (Schlicht und Schaller, 1989). Im C-Gen gibt es zwei genutzte Startcodons, die zur Synthese des Kapsidproteins (HBcAg)

oder einer davon abgeleiteten löslichen Form (HBeAg) führen. Im S-Gen liegen drei Initiationsstellen zur Expression der drei koterminalen Formen des HBsAg (*large*: lHBsAg, *middle*: mHBsAg und *small*: sHBsAg). Der längste Genabschnitt, P, kodiert die virale Polymerase, der kürzeste, X, das HBx-Protein. Die Kodierungskapazität der vorhandenen 3200 nt entspricht der von 5500 nt in linearer Form angeordneten. Der Plusstrang enthält ebenfalls offene Leserahmen, denen bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte.

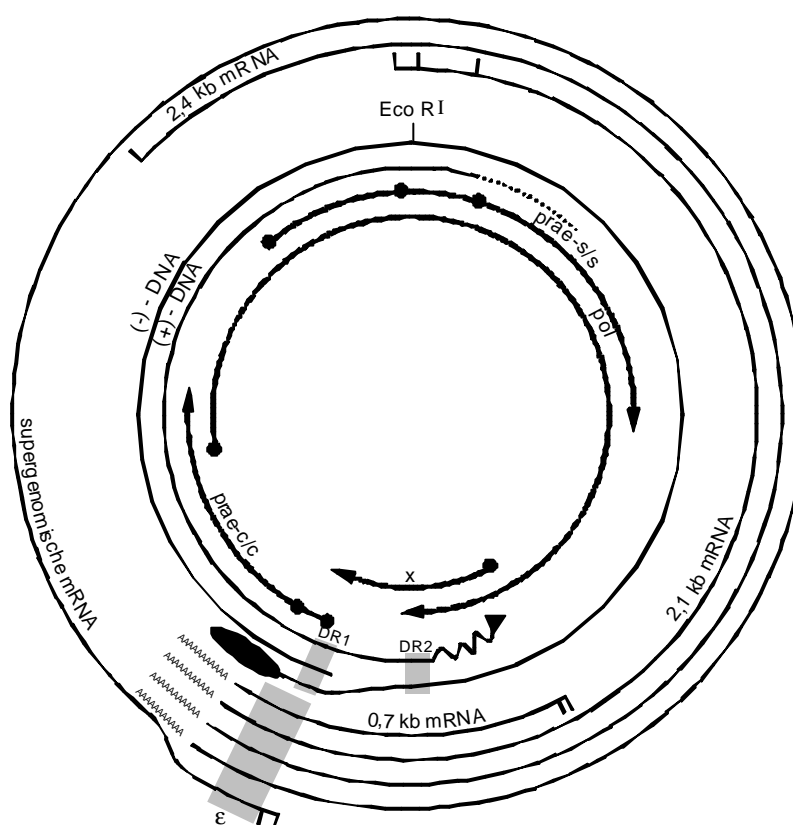


Abbildung 1-4: Genomorganisation des Hepatitis B-Virus.

Gezeigt ist (von innen nach außen) die Lage der vier offenen Leserahmen (x, pol, Prae-c/c und Prae-s/s), das Genom mit einigen strukturellen Details (ε: Epsilon-RNA-Verpackungssignal; DR1, DR2: *direct repeat* 1 und 2; Oligoribonukleotid am 5'-Ende des Plusstranges; Primase-Domäne der Polymerase am 5'-Ende des Minusstranges) und die vier Klassen von Transkripten. Alle Gene befinden sich auf dem Minusstrang und sind durch Pfeile symbolisiert. Die Punkte geben die Translationsstartpunkte wieder. Am 5'-Ende der vier mRNAs sind (soweit bekannt) die verschiedenen Transkriptionsstartpunkte angedeutet, an deren 3' Ende die Polyadenylierung. *EcoRI*: Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI*; das erste Adenin in dessen Erkennungssequenz gilt als Startpunkt für die Nummerierung der Basen (Weinberger, 2000).

1.4.3 Expression der viralen Proteine

1.4.3.1 Die Hüllproteine — HBsAg

Der PräS/S-Leserahmen im HBV-Genom kodiert für die Hüllproteine des Virus. Die Proteine werden allgemein unter dem Begriff Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) zusammengefaßt, im einzelnen jedoch entsprechend ihrer Größe als s, m und lHBsAg bezeichnet (siehe 1.3.1). Zusätzlich kann jedes dieser drei Proteine aufgrund fakultativer und/oder obligatorischer Glykosylierung in zwei verschiedenen Formen vorliegen.

Je nach Genotyp umfaßt der PräS/S-Genbereich 389-400 Tripletts (Abb. 1-5). Die ersten 108-119 Tripletts kodieren den PräS1-Bereich, gefolgt von 55 Tripletts des PräS2-Bereichs und daran anschließend die 226 Tripletts des eigentlichen S-Bereichs (Heermann *et al.*, 1984). Jedes der drei koterminalen Proteine wird von einem eigenen Startcodon aus translatiert. Beginnt die Translation am dritten Startcodon des S-Leserahmens, entsteht das sHBsAg, ein 226 Aminosäuren langes Protein, das den größten Teil der *in vivo* synthetisierten Hüllproteine ausmacht. Dieses Protein kann bis zu einem Anteil von 40 % an der Position ¹⁴⁶Asn N-glykosyliert vorliegen, wodurch bei elektrophoretischer Auftrennung die beiden Formen p25 (unglykosyliert) und gp28 (glykosyliert) unterschieden werden können. Durch einen Translationsstart am PräS2-Startcodon entsteht das 281 Aminosäuren lange mHBsAg. Auch hier befindet sich an Position 201 eine fakultative Glykosylierungsstelle (durch sterische Behinderung durch das PräS-Peptid findet die Glykosylierung hier weniger häufig statt als beim sHBsAg) und zusätzlich eine obligatorische Mannose-reiche Glykosylierungsstelle an Position 4. Somit werden in diesem Fall zwei Glykoproteine mit einer Molmasse von 33 und 36 kD gefunden (einfach glykosyliert: gp33; zweifach glykosyliert: gp36).

Von der 2,4 kb-mRNA leitet sich das große HBsAg (lHBsAg) ab, dessen Startcodon 108-119 Tripletts oberhalb des Startcodons für das mHBsAg liegt. Das 389-400 Aminosäuren lange Protein (genotypabhängig: A, B, C, F: 400; D: 389; E, G: 399 Aminosäuren) weist an Position 320 die erwähnte fakultative N-Glykosylierung auf, während die Glykosylierungsstelle des mHBsAg nicht verwendet wird und somit eine

unglykosylierte (p39) und eine glykosylierte (gp42) Form des IHBsAg vorliegt. Betrachtet man die Häufigkeit der einzelnen Formen, so stellt das sHBsAg insgesamt den größten Anteil des zirkulierenden HBsAg dar gefolgt von mHBsAg (5-15 %) und IHBsAg (1-2 %). Ein Unterschied besteht in der Verteilung der letzteren auf die subviralen Partikel; das IHBsAg ist in großer Menge in der Virushülle vorhanden, während es in den 22 nm-Partikeln nicht auftritt, wohingegen das mHBsAg vergleichbar häufig auf allen Partikeln vorkommt. Es wird vermutet, daß der Expressionsgrad des IHBsAg auf bislang unklare Weise für die Partikelmorphologie verantwortlich ist (Marquardt *et al.*, 1987), wobei eine Überexpression des IHBsAg verglichen mit dem sHBsAg zu einer verstärkten Bildung von filamentösen Partikeln führt, die aufgrund eines im PräS1-Bereich befindlichen Retentionssignals im Endoplasmatischen Retikulum (ER) angereichert werden (Persing *et al.*, 1987; Chisari *et al.*, 1987; Gallina *et al.*, 1995).

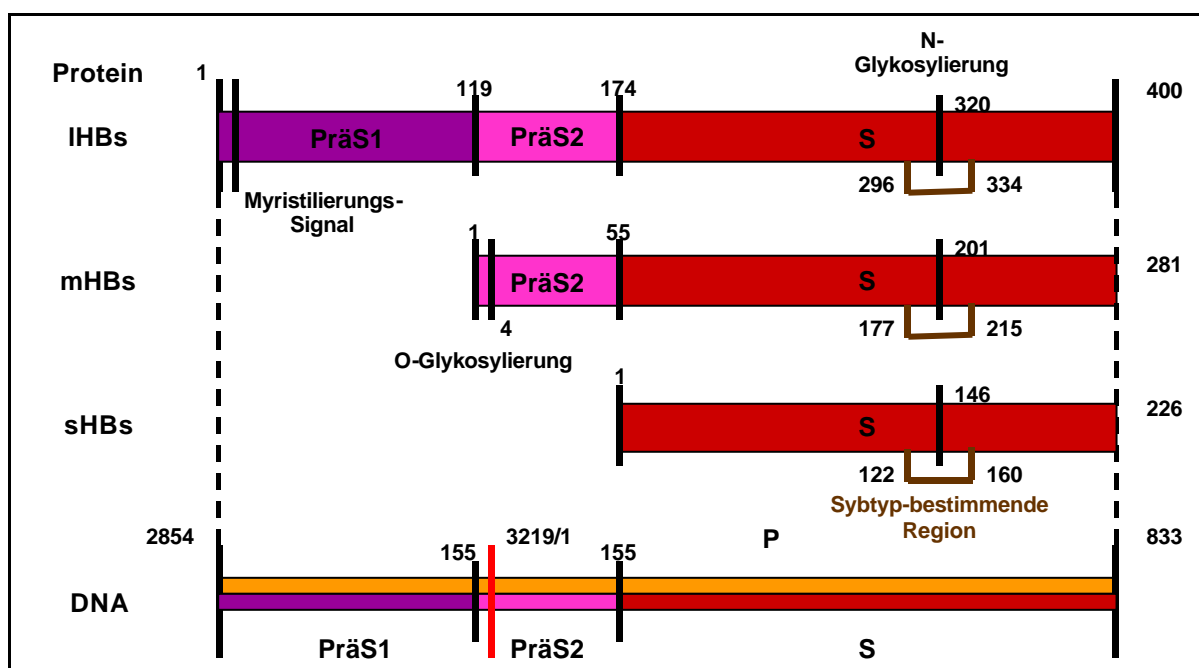


Abbildung 1-5: Darstellung der Domänenstruktur der HBV-Hüllproteine.

Gezeigt ist der Leserahmen des S-Gens (inklusive des überlappenden Bereichs des P-Leserahmens) innerhalb des HBV-Genoms (PräS1-, PräS2 und S-Domäne) und die davon abgeleiteten Proteine (IHBs, mHBs und sHBs). Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb des jeweiligen Proteins bzw. die Nukleotidposition innerhalb des Leserahmens bezogen auf den HBV-Subtyp adw2 an. IHBsAg: großes Hüllprotein; mHBsAg: mittleres Hüllprotein; sHBsAg: kleines Hüllprotein.

1.4.3.2 Das Kapsidprotein — HBcAg

Die Proteine des viralen Nukleokapsids (Hepatitis B-Core-Antigen, HBcAg) werden von der kürzeren Form der supergenomischen mRNA translatiert und umfassen 183-195 Aminosäuren bei einer Molmasse von 21 kD (Abb. 1-6). Neben seiner strukturebenen Funktion (siehe 1.3.1) ist das Core-Protein zudem an der Verpackung und Komplexierung der prägenomischen RNA beteiligt. Die spezifische Verpackung des Prägenoms wird durch die virale Polymerase unter Beteiligung zellulärer Chaperone (Hsp90) vermittelt. Neben der endogenen Polymerase wird auch eine zelluläre Proteinkinase C verpackt, die nach der Partikelreifung die carboxyterminale Domäne des Core-Proteins phosphoryliert und somit eine Interaktion von Kapsid und Nukleinsäure verhindert. Die dadurch im Virion frei vorliegende Nukleinsäure kann bei einem nachfolgenden Infektionszyklus leicht aus den Core-Partikeln freigesetzt werden.

1.4.3.3 Das HBe-Antigen

Die C-Genregion kodiert neben dem HBcAg auch für das HBeAg, dessen Translation am ersten Initiationscodon AUG der supergenomischen RNA beginnt (Abb. 1-6). Der 87 nt lange aminoterminal Bereich, der nur im HBeAg vorliegt, wird auch als PräC-Region bezeichnet, während der gemeinsame Abschnitt von HBeAg und HBcAg als Core-Region bezeichnet wird. Das Produkt dieser PräC-Region besitzt Signalpeptid-Charakter, was zur Translokation des naszierenden Polypeptids in das ER-Lumen führt. Da diese Translokation nicht vollständig erfolgt, verbleibt ein kleiner Teil des 25 kD großen HBeAg im Cytosol und kann von dort aufgrund seines carboxyterminalen Kernlokalisierungssignals in den Zellkern transportiert werden. Noch während der Translation am ER wird das 19 Aminosäuren lange Signalpeptid durch eine zelluläre Signalpeptidase abgespalten. Zusätzlich wird das naszierende HBeAg in einem zweiten proteolytischen Schritt carboxyterminal verkürzt, so daß letztendlich ein 17 kD großes Protein entsteht. Diese Spaltung ist Grundvoraussetzung für den Export des HBeAg aus der Zelle. Das HBeAg liegt als lösliches Antigen im Serum vieler hochvirämischer Virusträger vor, wobei seine Konzentration die des

HBcAg bei weitem übersteigt. Die Funktion des HBeAg im viralen Lebenszyklus ist unklar. Auch HBeAg-Proteine können oligomerisieren, bilden jedoch im Gegensatz zu HBcAg keine vollständigen Partikel (Schlicht und Wasenauer, 1991).

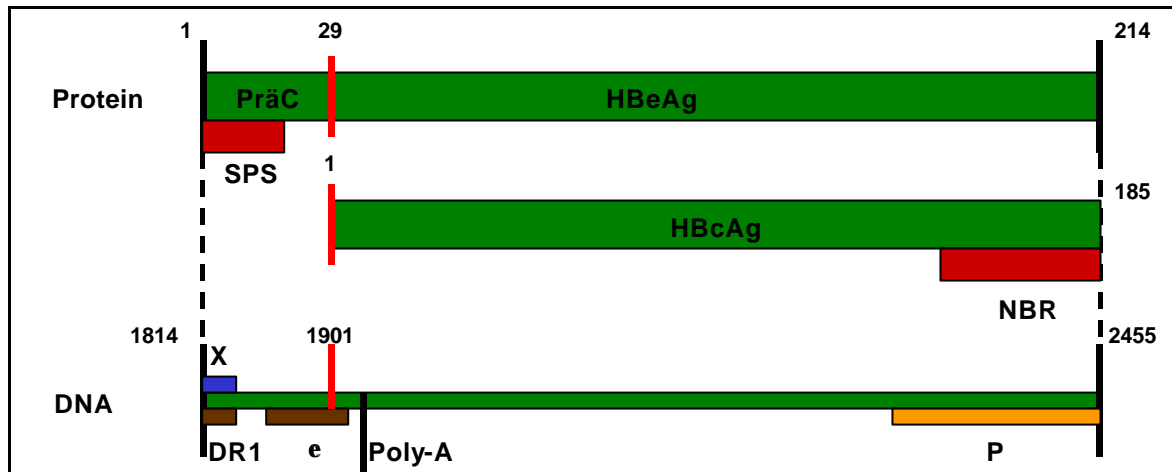


Abbildung 1-6: Darstellung der Domänenstruktur des HBV-Kapsidproteins (HBcAg) und des davon abgeleiteten HBeAg und HBcAg

Gezeigt ist der Leserahmen des C-Gens (inklusive des überlappenden Bereichs des P- und X-Leserahmens) innerhalb des HBV-Genoms und die davon abgeleiteten Proteine (HBcAg und HBeAg). Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb des jeweiligen Proteins bzw. die Nukleotidposition innerhalb des Leserahmens bezogen auf den HBV-Subtyp adw2 an.

DR1: *direct repeat 1*; ε: RNA-Verpackungssignal; NBR: Nukleinsäure-Bindungsregion; SPS: Signal-Peptid-Sequenz; Poly-A: Poly-Adenylierungs-Sequenz

1.4.3.4 Die Polymerase

Die P-Genregion ist der größte offene Leserahmen, umfaßt etwa 80 % des gesamten Genoms und kodiert für die virale Polymerase (Abb. 1-7). Diese wird von der kürzeren Form der supergenomischen mRNA durch *de novo*-Initiation am Startcodon der Polymerase translatiert. Die Polymerase ist mit 832-845 Aminosäuren Länge (je nach Genotyp) und einer Molmasse von 92 kD das größte der viralen Proteine und stellt ein multifunktionales Enzym mit vier Domänen dar. Der aminoterminal Bereich, die Primase-Domäne, initiiert am RNA-Prägenom die Synthese des Minusstranges (Bartenschlager und Schaller, 1988). Diese Domäne ist im Virion über die Hydroxylgruppe der Seitenkette des ⁶³Tyr kovalent an das 5'-Ende des Minusstranges

gebunden. Aufgrund dieser Tatsache wird auch oft die Bezeichnung terminales Protein (TP) verwendet. Dem sich anschließenden Bereich konnte noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden; er gilt als eine Art „Abstandshalter“ (*Spacer*) zwischen Primer-Protein und den Domänen mit Polymerase- und RNase H-Aktivität (Faruqi *et al.*, 1991). Die HBV-Polymerase weist in ihrer Struktur und Sequenz deutliche Homologien zu den Reversen Transkriptasen der Retroviren auf. Im aktiven Zentrum der Polymerase befindet sich ein konserviertes Motiv (Tyr-Met-Asp-Asp; YMDD), welches für die volle enzymatische Aktivität essentiell ist.

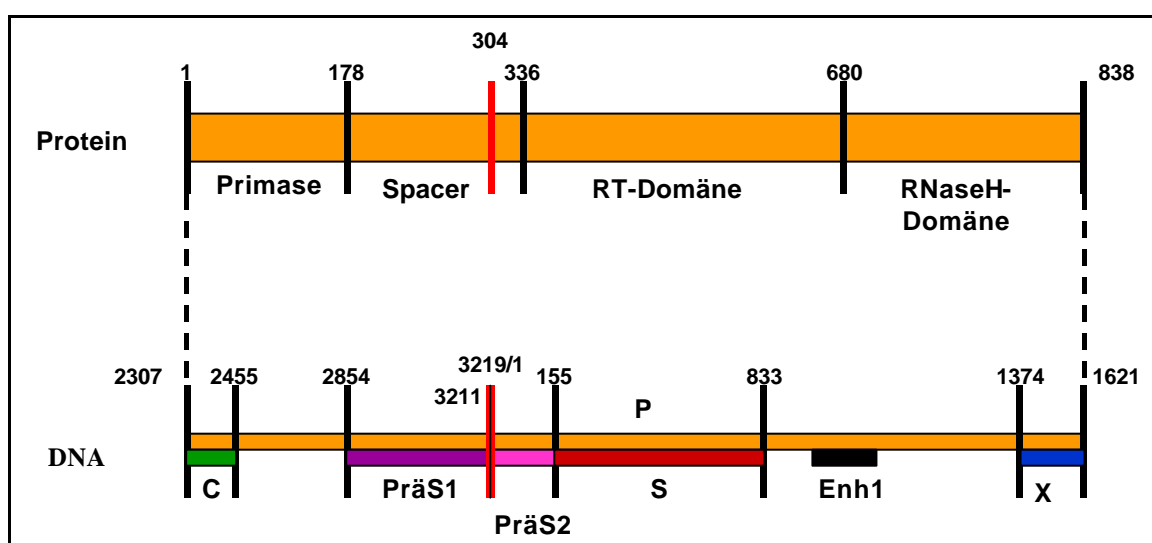


Abbildung 1-7: Darstellung der Domänenstruktur der HBV-Polymerase.

Gezeigt ist der Leserahmen des P-Gens (inklusive des überlappenden Bereichs des S-, C- und X-Leserahmens) innerhalb des HBV-Genoms und das davon abgeleitete Polymerase-Protein. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb des Proteins bzw. die Nukleotidpositionen innerhalb des Leserahmens bezogen auf den HBV-Subtyp adw2 an. Enh1: Enhancer 1; RT: Reverse Transkriptase.

1.4.3.5 Das HBx-Antigen

Das X-Gen kodiert für das kleinste der HBV-Proteine, das HBx-Antigen (HBxAg) mit einer Länge von 154 Aminosäuren und einer Molmasse von 16-18 kD (Abb. 1-8), dessen genaue Funktion bis heute äußerst kontrovers diskutiert wird. HBxAg wurde bislang nur in Vertretern der Orthohepadnaviren gefunden, was die Vermutung zulässt, daß es für die Replikation der Hepadnaviren nicht essentiell ist (Yaginuma *et al.*,

1987). Im Woodchuckmodell wurde jedoch gezeigt, daß HBxAg für die Etablierung der chronischen Infektion benötigt wird (Chen *et al.*, 1993; Zoulim *et al.*, 1994a).

Das HBx-Protein ist ein multifunktionales, regulatorisches Protein, das eine Vielzahl von Wirtsfunktionen moduliert und unter anderem neben den HBV-spezifischen auch eine Reihe zellulärer Promotoren transaktivieren kann.

Für das HBx-Protein konnte bislang keine DNA-Bindungsdomäne gefunden werden, weshalb vermutet wird, daß es seine Funktion über Protein/Proteinwechselwirkungen ausübt (Maguire *et al.*, 1991). *In vitro* wurden für das HBx-Protein eine Vielzahl potentieller nukleärer Bindungspartner identifiziert, wie z. B. der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Oct1, die TATA-Bindeproteine TFIID und TFIIB, das Tumor-Suppressorprotein p53 sowie die Proteasomen-Untereinheit XAP-P13 (Murakami, 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das HBxAg möglicherweise bei der leberspezifischen HBV-Expression eine Rolle spielt. Zumindest eine Beteiligung des HBxAg an der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) scheint unumstritten. Su und Mitarbeiter konnten in 50 % aller untersuchten HCC die Expression von HBx nachweisen (Su *et al.*, 1998). Dem HBxAg wird dabei jedoch ein eher geringes onkogenes Potential zugeschrieben, das nur in Kombination mit anderen onkogenen Faktoren zum Tragen kommt.

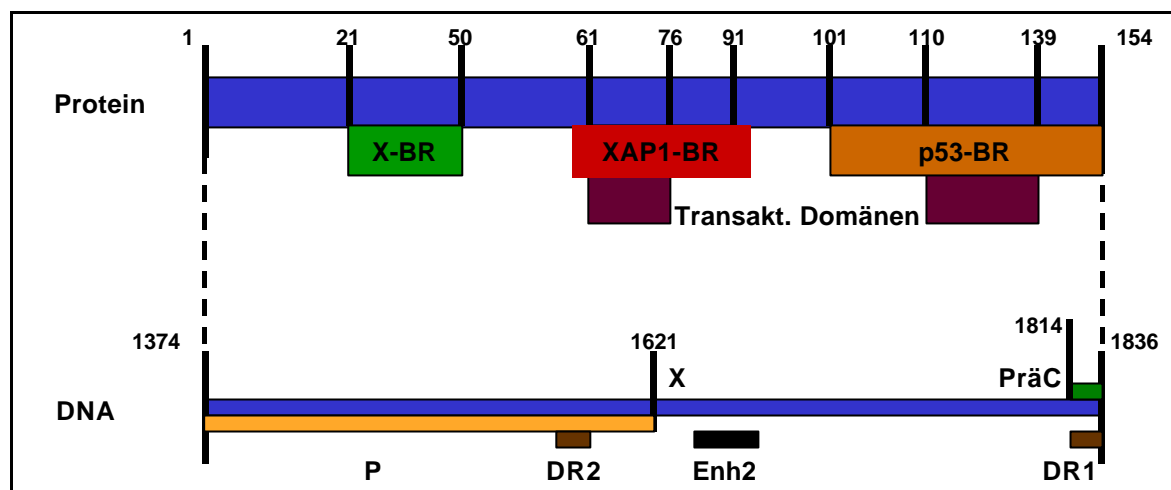


Abbildung 1-8: Darstellung der Domänenstruktur des HBx-Proteins.

Gezeigt ist der Leserahmen des X-Gens (inklusive des überlappenden Bereichs des P- und C-Leserahmens) innerhalb des HBV-Genoms und das davon abgeleitete HBx-Protein. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb des Proteins bzw. die Nukleotidpositionen innerhalb des Leserahmens bezogen auf den HBV-Subtyp adw2 an. Die wichtigsten Domänen innerhalb des HBx-Proteins sind dargestellt.

DR1, DR2: *direct repeat* 1 und 2; Enh2: *Enhancer* 2; X-BR: X-Bindungs-Region; XAP1-BR: XAP1-Bindungsregion; p53-BR: p53-Bindungsregion.

1.5 Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus

Über den genauen Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus herrschte lange Zeit Unklarheit, was vor allem auf das Fehlen eines geeigneten Zellkulturmodells zurückzuführen ist. Die Etablierung einer stabil infizierbaren Zelllinie wurde nicht zuletzt durch den ausgeprägten Zelltropismus des Hepatitis B-Virus erschwert. Arbeiten von Will und Mitarbeitern, die die Infektiösität klonierter hepadnaviraler DNA zeigen konnten, eröffneten erstmals die Möglichkeit, durch Transfektion von HBV-DNA in einfach kultivierbare Hepatomzelllinien infektiöse Virionen zu produzieren und so die Schritte des viralen Lebenszyklus, beginnend mit der Transkription der viralen mRNA, zu untersuchen (Will *et al.*, 1985; Yaginuma *et al.*, 1987). Vor allem über die sehr frühen Schritte der Anheftung und Aufnahme von HBV an die Zielzelle ist bislang wenig bekannt.

1.5.1 Infektion der Zielzelle

Da auch durch Transfektion von HBV-DNA in nicht-humane Leberzellen infektiöse Virionen produziert werden, muß die extreme Spezies-Spezifität des Virus bereits durch einen frühen Schritt im viralen Lebenszyklus, wie etwa die Anheftung und Aufnahme determiniert sein. Der Eintritt des Virus in die Zielzelle erfolgt entweder über Rezeptor-vermittelte Bindung und Endozytose oder aber durch Fusion des Virus mit der Zellmembran. In Infektionsversuchen mit primären humanen Hepatozyten und Untersuchungen an Plasmamembranen humaner Hepatozyten wurden mehrere potentielle zelluläre Rezeptoren charakterisiert. So werden neben Endonexin III (de Bruin *et al.*, 1994) und Annexin V (Petit *et al.*, 1997) auch Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ein Serin-Protease-Inhibitor und der Asialoglykolprotein-Rezeptor als mögliche zelluläre HBV-Rezeptoren beschrieben (Hertogs *et al.*, 1994; Treichel *et al.*, 1997; Pontisso *et al.*, 2000).

Einfacher gestaltet sich die Suche nach dem viralen Rezeptor, da hier nur ein Bestandteil eines der drei Hüllproteine in Frage kommt. Die Aminosäuren 5-18 der PräS2-Domäne des lHBsAg und mHBsAg weisen eine Bindungsstelle für Serumalbumin auf, welches wiederum an Hepatozyten bindet (Machida *et al.*, 1984; Krone *et al.*, 1990; Sobotta *et al.*, 2000). Dies spricht für eine Serumalbumin-vermittelte speziesspezifische Anheftungsstelle des HBV (Thung und Gerber, 1984). Da jedoch das mHBsAg für die Infektiösität des Virus nicht essentiell ist (Fernholz *et al.*, 1993; Sureau und Lanford, 1993), kommt diesem Bereich bestenfalls eine akzessorische Rolle bei der Anheftung zu. Der Befund, daß filamentöse Partikel im Gegensatz zu 22 nm-Partikeln hochaffin an Lebermembranen binden, deutet dagegen darauf hin, daß die Bindungsstelle im Bereich der PräS1-Region liegt. Belegt wurde diese Vermutung durch Inhibitionsversuche mit monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche PräS1-Bereiche, in denen sowohl die Bindung des Virus als auch die Aufnahme blockiert werden konnten (Pontisso *et al.*, 1989; Petit *et al.*, 1991; Neurath *et al.*, 1992).

1.5.2 Kerntransport und Bildung der cccDNA

In der Zelle erfolgt die Freisetzung des Nukleokapsids aus der Virushülle und der Transport zum Zellkern. Der Nachweis eines nukleären Transportsignals am C-Terminus des Core-Proteins (McLachlan *et al.*, 1987; Ou *et al.*, 1989; Yeh *et al.*, 1990) läßt vermuten, daß die Kapside dabei als Transporter für die virale Nukleinsäure dienen und beispielsweise durch Motorproteine aktiv zum Kern befördert werden (Vallee und Sheptner, 1990). Aufgrund der Größe der Kernporen (25 nm) ist es jedoch unwahrscheinlich, daß vollständige Core-Partikel, die eine Größe von 30 bzw. 34 nm aufweisen (Kann und Gerlich, 1998), durch Diffusion in den Zellkern gelangen. Man geht vielmehr davon aus, daß an den Kernporen eine Auflösung der Kapside induziert und die genomische DNA als Komplex mit der viralen Polymerase in den Zellkern transloziert wird (Kann *et al.*, 1997).

Im Zellkern liegt das Genom zunächst als partiell ds DNA vor, die von zellulären Reparaturenzymen zum replikativen Intermediat (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) komplettiert wird (Köck und Schlicht, 1993). Hierfür werden die Primerstrukturen an den 5'-Enden, das Terminale Protein sowie die redundanten Bereiche des Minusstranges entfernt, der Plusstrang vervollständigt und die Enden durch eine zelluläre Ligase zur cccDNA verknüpft. Das zirkuläre DNA-Molekül liegt nun extrachromosomal an Nukleosomen gebunden im Zellkern vor. An all diesen Prozessen ist die virale Polymerase nicht beteiligt (Köck und Schlicht, 1993).

1.5.3 Transkription und Translation

Die Transkription der cccDNA erfolgt durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II und führt zur Bildung von vier Transkripten, die von vier Promotoren aus abgelesen und entsprechend ihrer Länge oder dem primären Transkriptionsprodukt benannt werden. Zwei Arten von RNAs können auftreten: RNAs von subgenomischer Länge, die für das X-Protein sowie die Hüllproteine kodieren und RNAs die länger als das eigentliche Genom sind, sogenannte supergenomische RNAs, die für das HBeAg, das HBcAg sowie die Polymerase kodieren.

Die subgenomischen RNAs treten in drei unterschiedlichen Längen auf, von denen die längere 2,4 kb-mRNA *in vivo* in relativ geringem Umfang transkribiert wird und zur Expression des großen Oberflächenproteins (IHBs) dient. Bedingt durch den zugehörigen PräS1-Promotor, der HNF1- und HNF3-Bindungsstellen (*hepatonuclear factors*, HNF) aufweist, erfolgt die Transkription weitgehend hepatozytenspezifisch (Will *et al.*, 1987; Courtois *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1989).

Das Transkript der dominanten 2,1 kb langen mRNA kodiert für die beiden kleineren Formen der Hüllproteine (mHBs und sHBs). Je nachdem, welches der beiden Transkriptionsstartsignale verwendet wird, entsteht eine PräS2/S-mRNA bzw. eine S-mRNA. Die Transkription wird durch den PräS2/S-Promotor reguliert, der vor dem PräS2-Startcodon lokalisiert ist. (Raney *et al.*, 1992). Die kleinste der subgenomischen mRNAs ist 0,7 kb groß und kodiert für das HBx-Protein (Kaneko und Miller, 1988), wobei die Transkription durch den HBx-Promotor und der unmittelbar vor dem HBx-Startcodon liegenden Enhancerregion I reguliert wird (Schaller und Fischer, 1991).

Der Core-Promotor vermittelt die Bildung zweier Transkripte, die von unterschiedlichen Startpunkten ausgehen. Das längere, das PräC-Startcodon beinhaltende Transkript führt zur Expression des HBeAg, während die kürzere Form als mRNA für das HBcAg sowie die Polymerase fungiert. Zusätzlich dient dieses Replikationsintermediat, die sog. prägenomische RNA (pgRNA) auch als Matrize für die reverse Transkription.

Die Transkription dieser RNAs wird durch den Core-Promotor reguliert, der zwischen den beiden repetitiven Sequenzen DR1 und DR2 liegt, Bindungsstellen für HNF4 und C/EBP aufweist und dadurch vorwiegend leberspezifisch wirkt (Rall *et al.*, 1983; Karpen *et al.*, 1988; Honigwachs *et al.*, 1989). Um eine maximale Transkriptionsaktivität zu erreichen, sind zudem die beiden Enhancer I und II nötig, die ebenfalls eine hohe Gewebespezifität aufweisen (Treinin und Laub, 1987).

1.5.4 Bildung des viralen Nukleokapsids und Partikelreifung

Der Zusammenbau (*assembly*) der Virionen verläuft grundsätzlich nach einem ähnlichen Mechanismus wie im Fall anderer umhüllter Viren. Die Hüllproteine werden unter Ausschluß von wirtseigenen Proteinen in Form von Transmembranproteinen in die Membran des ER inseriert. Im allgemeinen können diese Hüllproteine die Zelle jedoch nur verlassen, wenn der Mechanismus der Knospung induziert wird, was in der Regel nach Interaktion der Hüllproteine mit anderen viralen Komponenten (Kapsid, Nukleinsäure) geschieht.

Im Fall des Hepatitis B-Virus können jedoch auch Hüllproteine in Form von subviralen Partikeln, ohne Nukleokapsid und Genom, sezerniert werden. Da also HBs-Proteine die Zelle ohne Nukleokapside verlassen können, muß ein Mechanismus vorhanden sein, der sicherstellt, daß genügend Hüllproteine zur Umhüllung der Kapside vorhanden sind und diese intrazellulär mit Hilfe eines Retentionssignales zurückgehalten werden. Ein Retentionssignal, das gleichzeitig das in der S-Sequenz befindliche Sezernierungssignal unterdrückt, wurde im Bereich der PräS1-Sequenz identifiziert. Bestätigt wird diese Annahme in Versuchen, in denen IHBs in Anwesenheit von mHBs und sHBs überexprimiert wurde, was zu einer dosisabhängigen Inhibition der Sekretion dieser Proteine und zur Akkumulation im ER führt (Gallina *et al.*, 1995).

Das *assembly* erfolgt in einem zweistufigen Prozeß, bei dem es zunächst zur Dimerisierung von Core-Proteinen kommt, die sich ohne weitere Zwischenstufen zu vollständigen Kapsiden zusammenlagern (Zhou *et al.*, 1992; Seifer *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994). Die Verpackung der pg HBV-RNA erfolgt durch Wechselwirkung mit der viralen Polymerase, wobei zelluläre Hsp90-Chaperone eine akzessorische Rolle spielen (Hu und Seeger, 1996). Ein innerhalb der Ortho- und Avihepadnaviren weitgehend konserviertes Verpackungssignal (ϵ) wurde in der PräC-Region der prägenomischen RNA lokalisiert. Es besteht aus etwa 100 nt und formt durch interne Basenpaarung eine definierte Sekundärstruktur, die für die Interaktion mit der viralen Polymerase entscheidend ist.

Lediglich das 5'-ε der pg mRNA induziert die Verpackung (Nassal und Schaller, 1996), wobei zusätzliche cis-aktive Elemente nötig sind. Diese erhöhen die Effizienz der Verpackung und sind vermutlich für die Fähigkeit der viralen Polymerase verantwortlich, zwischen funktionellem 5'-ε der pg und inaktivem 3'- und 5'-ε auf subgenomischen mRNAs und supergenomischer HBe-mRNA zu unterscheiden (Hirsch *et al.*, 1990; Calvert und Summers, 1994).

Die Ausbildung von subviralen Partikeln und die Fertigstellung von kompletten Virionen durch Umhüllung der Nukleokapside ist räumlich und regulatorisch eng mit der Synthese der Hüllproteine verknüpft. Diese werden als Transmembranproteine im ER gebildet und durchlaufen dann den sekretorischen Weg inklusive fakultativer bzw. obligatorischer Glykosylierung. Zur korrekten Morphogenese des HBV sind sowohl IHBs- als auch sHBs-Proteine nötig, während mHBs nicht essentiell ist. Nach einer Modellvorstellung verbleibt das IHBs-Protein in der ER-Membran und steht somit für eine Interaktion mit dem Nukleokapsid zur Verfügung (Kann und Gerlich, 1998). Nach der Umhüllung des Kapsids wird dann bedingt durch die Elemente des sHBs-Proteins die Sekretion der Virionen induziert.

1.5.5 Replikation

Die Vermehrung des HBV-Genoms erfolgt durch reverse Transkription der pg RNA, die zuvor im Zellkern ausgehend von der cccDNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II gebildet wurde (Seeger *et al.*, 1986; Will *et al.*, 1987). Nach Verpackung der pg RNA beginnt in den zytoplasmatischen unreifen Kapsiden die Synthese des DNA-Minusstranges, wobei die virale Polymerase durch zelluläres Hsp90 aktiviert wird (Hu und Seeger, 1996). Die aminoterminal Domäne der HBV-Polymerase dient als Primer zur Initiation der DNA-Synthese (Bartenschlager und Schaller, 1988). Die Replikation beginnt mit der Synthese von vier Nukleotiden in der ε-Sequenz am 5'-Ende der pgRNA, wobei die Kopplung des ersten Nukleotides an die freie Hydroxylgruppe des ⁶³Tyr der Seitenkette erfolgt (Zoulim und Seeger, 1994). Durch einen noch unklaren Mechanismus kommt es zur Translokation des Komplexes aus aktivierter Polymerase und kovalent gebundenem DNA-Oligonukleotid an eine

komplementäre Sequenz im DR1 des 3'-Endes der pgRNA (Lien *et al.*, 1987; Will *et al.*, 1987). Ausgehend davon erfolgt die Synthese des Minusstranges bis zum 5'-Ende der pgRNA. Der Minusstrang weist hierbei an beiden Enden eine kurze terminale Redundanz auf, die für die Plusstrangsynthese von entscheidender Bedeutung ist. Synchron zur Synthese des DNA-Minusstranges wird durch die RNase H-Aktivität der Polymerase das RNA-Prägenom im entstandenen DNA-RNA-Hybrid bis auf 18 Nukleotide abgebaut (Chang *et al.*, 1990; Radziwill *et al.*, 1990). Dieser Bereich, bestehend aus 5'-Ende, DR1 und *Cap*-Sequenz, dient als Primer für die Synthese der Plusstrang-DNA und ist auch im reifen Virion kovalent an dessen Ende gebunden (Molnar-Kimber *et al.*, 1984; Lien *et al.*, 1987; Will *et al.*, 1987). In einer zweiten Translokation wird dieser Primer an den DR2-Bereich der Minusstrang-DNA versetzt, wobei auch hier der Mechanismus völlig unklar ist. Die Synthese des Plusstranges müßte am Ende des Minusstranges und dem daran gebundenen Protein stoppen, da die 3'- und 5'-Enden des zuvor synthetisierten Minusstranges noch nicht verknüpft sind. Bei der Synthese des Plusstranges entsteht jedoch eine redundante Sequenz, die sich sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des Minusstranges befindet. Dies ermöglicht die dritte Translokation des Replikationszyklus, bei der durch einen Matrizen-Wechsel (sog. *template switch*) die Plusstrangsynthese vom 5'- zum 3'-Ende des Minusstranges wechselt. Von hier aus erfolgt die weitere Plusstrangsynthese, die jedoch bedingt durch den begrenzten Nukleotidpool im Kapsid-Lumen bei etwa 30-50 % der Gesamtlänge abbricht, was zu dem für Hepadnaviren charakteristischen, partiell ds DNA-Genom führt (Robinson *et al.*, 1974; Summers *et al.*, 1975; Ganem *et al.*, 1982).

1.6 Epidemiologie der Hepatitis B

1.6.1 Übertragungsweg

Das Hepatitis B-Virus wird parenteral übertragen. Dabei spielt insbesondere in den Hochendemiegebieten die vertikale -meist perinatale- und etwa in gleichem Ausmaß

die horizontale Übertragung in der Kindheit eine entscheidende Rolle (Wainwright *et al.*, 1986; Kaldor *et al.*, 1996; Duskeiko *et al.*, 1997; Basaras *et al.*, 1999; Vardas *et al.*, 1999), wohingegen in den Industrienationen die horizontale Übertragung im frühen Erwachsenenalter, bei beginnender sexueller Aktivität, im Vordergrund steht (Hilleman *et al.*, 1988; Iwarson *et al.*, 1992; Chang und Chen, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). Eine häufige Übertragungsart, neben der Übertragung durch Sexualkontakte, ist hierbei immer noch die direkte Inokulation des Erregers etwa im medizinischen Bereich durch kontaminierte scharfe und spitze Gegenstände (Hollinger *et al.*, 1996). Durch stringente Kontrolle konnte die Übertragung durch Blut- und Blutprodukte -die Transfusionshepatitis- drastisch reduziert werden.

1.6.2 Verbreitung

Man geht heute davon aus, daß ca. 40 % der Weltbevölkerung Kontakt mit dem Hepatitis B-Erreger hatte (Kann und Gerlich, 1998; Hollinger *et al.*, 1996). Bei etwa 10 %, also ca. 300 Millionen Menschen besteht eine chronische Infektion, die bezüglich der Schwere der Erkrankung sehr unterschiedlich sein kann. HBV ist weltweit verbreitet, jedoch zeigen sich erhebliche geographische Unterschiede in der Prävalenz des Virus in der Bevölkerung. In den Hochendemiegebieten Südasiens, Zentral- und Südafrikas sind über 10 %, in bestimmten Gegenden bis zu 20 %, der Gesamtbevölkerung chronische Träger des Hepatitis B-Virus (Milne *et al.*, 1985; Patterson *et al.*, 1993; Bos *et al.*, 1995; Pawlotsky *et al.*, 1995; Rehmann *et al.*, 1996; Shimbo *et al.*, 1998; Chowdhury *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu findet man in Gebieten wie Nordafrika, im Nahen Osten, Indien und in weiten Teilen Osteuropas nur etwa 2- 5 % Virusträger. In West- und Nordeuropa, in Nordamerika, aber auch in Teilen Südamerikas ist weniger als 1 % der Bevölkerung chronisch infiziert (Douglas *et al.* 1993; Iwarson *et al.*, 1994; Perez *et al.*, 1996; Juarez-Figueroa *et al.*, 1998; Stamouli *et al.*, 1999). Hier gilt die Hepatitis B in erster Linie als Erkrankung von Risikogruppen, wie etwa Drogenabhängigen, Homosexuellen, Prostituierten und generell medizinischem oder zahnmedizinischem Personal. Obwohl seit Ende der 80er Jahre, bedingt durch geändertes sexuelles Verhalten und striktere hygienische

Maßnahmen, die Rate an HBV-Neuinfektionen in diesen Ländern sinkt, dürfte die tatsächliche Zahl um einiges höher liegen als angenommen. Hierbei erschwert vor allem der zumeist inapparente Verlauf der Infektion eine zuverlässige Registrierung aller Fälle.

1.7 Klinik und Diagnostik der Hepatitis B-Infektion

1.7.1 Klinik

Die Symptome einer akuten HBV-Infektion sind vielfältig. Bei gesunden Erwachsenen verläuft die akute Infektion in ca. 65 % aller Fälle asymptomatisch und anikterisch. Bei ca. 20-30 % der Patienten kommt es zum Auftreten von Krankheitssymptomen. Die akute Hepatitis beginnt mit einem Prodromalstadium, daß durch Fieber, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Erbrechen gekennzeichnet ist. Nach einigen Tagen setzt die ikterische Phase (die sog. „Gelbsucht“) ein, wobei die Gelbfärbung der Haut auf einer Anreicherung der Gallenfarbstoffe im Blut und Ablagerung von Bilirubin im Gewebe beruht. Bilirubin, ein Abbauprodukt des Hämoglobin, wird dabei durch die Schädigung des Leberparenchyms nicht mehr ausreichend über die Galle ausgeschieden.

Während bei 90-95 % der Patienten nach 3-4 Monaten eine völlige Ausheilung der Hepatitis zu beobachten ist, kann in 5-10 % der Fälle die HBV-Infektion in eine chronische Verlaufsform übergehen. Das Risiko einer Chronifizierung ist altersabhängig. Infizierte Neugeborene entwickeln zu etwa 95 % eine chronische Hepatitis, wohingegen sich der Prozentsatz bei 1-5-jährigen Kindern halbiert. Etwa ab dem 12. Lebensjahr entspricht der Chronifizierungsgrad dem bei Erwachsenen beobachteten Wert von 5-10 %.

Auf der Basis einer bestehenden chronischen HBV-Infektion kann es zur Entwicklung einer Leberzirrhose und zur Entwicklung eines primären hepatozellulären Karzinoms (HCC) kommen. Das Risiko an einem HCC zu erkranken ist bei chronischen Virusträgern gegenüber Menschen, die keinen Kontakt mit dem Virus hatten

signifikant erhöht. Die Tumorigenität der Hepatitisviren konnte auch im Tiermodell für weitere Orthohepadnaviren gezeigt werden (Marion *et al.*, 1986; Popper *et al.*, 1981; Gerin *et al.*, 1991; Seeger *et al.*, 1991; Transy *et al.*, 1992).

Kontrovers diskutiert wird die Frage nach dem genauen Mechanismus der Onkogenese (Murakami, 1999). Das HBx-Protein interagiert als multifunktionales regulatorisches Protein mit einer Reihe von viralen und zellulären Genprodukten, darunter c-jun, c-myc, c-fos und c-ras, sowie NF- κ B (Balsano *et al.*, 1991; Benn *et al.*, 1996; Avantaggiati *et al.*, 1993; Doria *et al.*, 1995; Chirillo *et al.*, 1996). Zusätzlich zu seinen transaktivierenden Eigenschaften kann HBxAg auch durch Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 in DNA-Reparatur-Prozesse eingreifen (Feitelson *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Truant *et al.*, 1995). Desweiteren ist auch der Einfluß von HBxAg auf unterschiedliche Signalkaskade-Kinasen sowie zahlreiche zelluläre Transkriptionsfaktoren beschrieben (Kekule *et al.*, 1993; Cheong *et al.*, 1995; Haviv *et al.*, 1996; Nomura *et al.*, 1999).

1.7.2 Diagnostik

Die Diagnostik einer HBV-Infektion stützt sich in erster Linie auf den serologischen Nachweis virusspezifischer Antigene und Antikörper (Tab. 1-2).

Eine akute HBV-Infektion ist durch die Anwesenheit von HBsAg im Serum gekennzeichnet, gefolgt von der Entwicklung Core-Protein-spezifischer Immunglobuline (anti-HBc-IgM und -IgG). Das vom Core-Protein abgeleitete HBeAg ist während der akuten Phase der Infektion für einige Zeit im Serum nachweisbar und wird von den entsprechenden Antikörpern (anti-HBe) abgelöst. Bei chronischen Infektionen hingegen bleibt HBeAg nachweisbar und gibt Hinweise auf die Aktivität der Infektion, da die HBeAg-Konzentration mit dem Vorhandensein von infektiösen Virionen korreliert. Die Rekonvaleszenzphase kennzeichnet sich demnach durch das Verschwinden von HBsAg und HBeAg aus dem Serum und einer Serokonversion zu anti-HBs- und anti-HBe-IgG. Der Schutz vor einer Reinfektion wird durch

neutralisierende Antikörper (anti-HBs) vermittelt. Der Nachweis von anti-HBc-IgG gilt als Marker für einen Kontakt mit dem Virus; anti-HBc findet sich sowohl bei akuten und chronischen als auch bei abgelaufenen Infektionen.

Zusätzlich zur Serologie gewinnt der Nachweis viraler DNA in letzter Zeit immer mehr Bedeutung. Die Entwicklung des 5'-Nuklease-Systems als homogenes Nachweissystem (*TaqMan-PCR*) ermöglicht dabei eine exakte Quantifizierung kombiniert mit hoher Empfindlichkeit und einem geringen Kontaminationsrisiko.

Tabelle 1-2: Serologische Befunde im Verlauf einer HBV-Infektion

	HBsAg	anti-HBs	anti-HBc	anti-HBc IgM	HBeAg	anti-HBe	HBV-DNA
späte Inkubationsphase	+	-	-	(+) -	(+) -	-	+
akute Infektion	+	-	+	+	+	-	+
abgelaufene Infektion	-	+	+/-	-	-	+/-	-
gesunder chronischer Virus-Träger	+	-	+	-	- (+)	+ (-)	- (+)

(+): seltene Befunde; (nach Jilg, 1997, modifiziert)

1.8 Immunprophylaxe der Hepatitis B

Eine gezielte Prophylaxe der Hepatitis B ist durch aktive und passive Immunisierung möglich. Um langfristig die Prävalenz von HBV zu senken, wurden in den letzten Jahren ausgedehnte Impfprogramme in Angriff genommen. Da neben dem Menschen kein weiterer relevanter, natürlicher Wirt existiert, ist somit eine Eradikation des Erregers, wie für das Pockenvirus bereits erfolgreich durchgeführt, durchaus im Bereich des Möglichen.

1.8.1 Passive Immunisierung

Zur Postexpositionsprophylaxe werden Hepatitis B-Immunglobulin-Präparate (HBIG), oftmals in Kombination mit einer aktiven Immunisierung eingesetzt. HBIG wird aus hochtitrigen anti-HBs-Seren gewonnen und vermittelt in etwa 75 % aller Fälle einen zuverlässigen Schutz vor der Entwicklung einer akuten Hepatitis (Seefe *et al.*, 1977; Grady *et al.*, 1978; Palmovic *et al.*, 1993). Die Nachteile bestehen darin, daß der Schutz nur einige Monate -bis zum Abfall des Antikörpertiters- anhält und diese Behandlung enorm kostenintensiv ist. Einsatz findet HBIG bei der Prophylaxe von Neugeborenen HBsAg-positiver Mütter, bei der Reinfektionsprophylaxe nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) bei chronischen HBV-Trägern und zur Postexpositionsprophylaxe nach Kontakt mit infiziertem Material (z. B. „Nadelstichverletzung“).

Gerade bei Neugeborenen HBsAg-positiver Mütter ist die alleinige Gabe von HBIG unzureichend, da so zwar die perinatale Infektion verhindert wird, nicht jedoch eine Infektion im Kleinkindalter, wofür -bedingt durch den anhaltenden Kontakt mit der viruspositiven Mutter- ein erhöhtes Risiko besteht. In diesen Fällen wird daher eine Kombinationsimmunisierung mit Hepatitis B-Immunglobulin (HBIG; Sofortschutz) und der aktiven Vakzine (Langzeitschutz) empfohlen. Dies vermittelt in 85-95 % aller Fälle einen Schutz vor perinataler Übertragung und späterer Infektion im Kleinkindalter (Stevens *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1985; Stevens *et al.*, 1988). Studien belegen auch die alleinige Wirkung der aktiven HBV-Vakzine zum Schutz dieser Neugeborenen (Andre *et al.*, 1994). Dies bietet gerade in den Hochendemiegebieten, in denen eine generelle passive Immunisierung aufgrund der hohen Kosten nicht durchführbar ist, eine Möglichkeit die hohe Rate an perinatalen Infektionen zu senken. Unter HBIG kommt es in etwa 50 % aller Fälle unter Selektionsdruck zum Auftreten von HBV-Mutanten, die den HBIG-vermittelten Schutz unterlaufen können, da dieser eine eng begrenzte Spezifität aufweist und im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, wie sie bei aktiver Immunisierung induziert wird, nicht anpassungsfähig ist.

1.8.2 Aktive Immunisierung

Das Fehlen eines geeigneten Zellkultursystems zur Virusanzucht *in vitro* sowie die Speziespezifität von HBV erschwerten lange die Entwicklung einer HBV-Vakzine. Anfang der 70er Jahre wurde auf der Basis von Seren hochvirämischer Patienten eine Plasma-Vakzine entwickelt, die Plasma in verdünnter und hitzeinaktivierter Form beinhaltete (Krugman *et al.*, 1971; Krugman und Giles, 1973). Zur Gewinnung einer wirksamen und zugleich sicheren Vakzine wurden in der Folge Methoden entwickelt, um aus Plasma gesunder Virusträger reine Präparationen subviraler Partikel (ohne meßbaren Anteil an HBV-DNA) herzustellen (Buyak *et al.*, 1976).

Das mit der Verwendung von Plasma-Vakzine verbundene Infektionsrisiko durch Kontaminationen führte schließlich zur Entwicklung der ersten gentechnisch hergestellten rekombinanten Vakzine (Valenzuela *et al.*, 1979; Valenzuela *et al.*, 1982; Harford *et al.*, 1983; McAleer *et al.*, 1984; Bitter *et al.*, 1988). Rekombinant synthetisierte HBsAg-Partikel gewährleisteten eine gleichbleibende Qualität der Vakzine und können, im Gegensatz zur Plasma-Vakzine, für die geeignete Spender nur begrenzt verfügbar sind, unbegrenzt hergestellt werden.

Erste Versuche HBsAg-Partikel in *Escherichia coli* zu exprimieren scheiterten an der unzureichenden Partikelbildung in diesem Expressionssystem, die für die Immunogenität der Vakzine von entscheidender Bedeutung ist. Die Expression von HBsAg in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) oder in eukaryontischen Zelllinien lieferte hingegen 22 nm-Partikel, die in ihrer Immunogenität keine Unterschiede zu HBsAg denen chronischer Virusträger aufweisen. Die rekombinante HBV-Vakzine induziert nach den ersten beiden Immunsierungen bei 70-90 %, nach vollendeter Grundimmunisierung in 90-95 % aller Fälle eine protektive Immunantwort (McLean *et al.*, 1983; West *et al.*, 1989; West *et al.*, 1993). Es verbleibt ein geringer Prozentsatz (ca. 5 %) an Personen, bei denen selbst nach wiederholter Immunisierung kein ausreichender Schutz aufgebaut wird (sog. *non-responder*).

1.8.3 Entwicklung neuer HBV-Vakzinen

Eine optimale Vakzine zeichnet sich durch hohe Sicherheit und Verträglichkeit aus, induziert bei einem hohen Prozentsatz der Geimpften einen protektiven Schutz und vermittelt ein langlebiges immunologisches Gedächtnis. Weiterhin sollte ein Impfstoff kostengünstig herstellbar, lagerbar und möglichst thermostabil sein, damit er auch in Ländern der Dritten Welt eingesetzt werden kann. Gerade in den letzten Kriterien zeigt sich der Nachteil der herkömmlichen HBV-Vakzine. Mit einer dreimaligen Immunisierung, zudem über einen relativ langen Zeitraum (6 Monate), einem Antigen, das ständiger Kühlung bedarf, und den mit der Herstellung verbundenen hohen Kosten ist sie für die in Hochendemiegebieten propagierte flächendeckende Vakzinierung nur bedingt geeignet.

Nicht zuletzt aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren eine Reihe neuer HBV-Vakzinen entwickelt und immunologisch evaluiert. Ziel war und ist es hierbei, die Immunogenität der Vakzine zu erhöhen, die Anzahl benötigter Dosen zu reduzieren und eine kostengünstige, breit einzusetzende Vakzine zu entwickeln.

Diese „neuen“ HBV-Vakzinen sollten, bedingt durch ihre erhöhte Immunogenität, bei *non-respondern*, die mit der herkömmlichen Vakzine geimpft worden waren, eingesetzt werden und bei der Immuntherapie der chronischen Hepatitis B (therapeutische Vakzinierung) Verwendung finden (z. B. T-Zell-Vakzine, DNA-Vakzine). Alle bislang durchgeführten Studien zeigen jedoch keine signifikanten Vorteile der bislang neu entwickelten HBV-Vakzinen im Vergleich zum bereits vorhandenen rekombinanten Impfstoff (Jilg *et al.*, 1998).

1.9 Immunologische Kontrolle der HBV-Infektion

1.9.1 HBV-Immunpathogenese

Die Pathogenität des Hepatitis B-Virus, das *per se* nicht zytopathisch für die infizierten Hepatozyten ist, beruht in erster Linie auf der zellulären Immunantwort seines Wirtsorganismus gegen virale Antigene bzw. infizierte Zellen (Chisari, 1997).

Es besteht weitgehende Übereinstimmung darin, daß beide Wege der Immunantwort - zellulär und humoral- für die Kontrolle der Infektion nötig sind (Abb. 1-9). Die Immunantwort bei einer akuten Hepatitis mit völliger Genesung des Patienten ist polyklonal und gegen alle viralen Proteine -mit Ausnahme des HBxAg- gerichtet. Im Gegensatz dazu wird bei chronischen Virusträgern eine allgemein schwächere und nur gegen einzelne Proteine gerichtete Immunantwort induziert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer chronischen Verlaufsform der Infektion und einer Störung der zellulären Immunabwehr wird vermutet. Bei Neugeborenen führt vor allem die neonatale Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen zu einer Persistenz des Virus und somit zu einer Chronifizierung der Infektion (Chisari *et al.*, 1997).

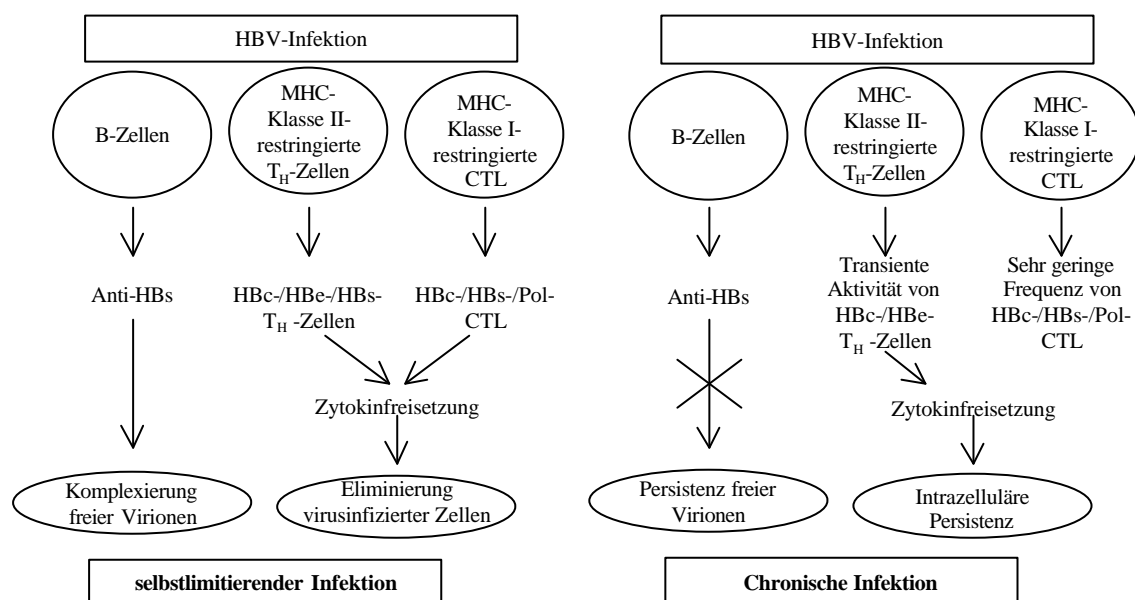


Abbildung 1-9: Zelluläre und humorale Immunantwort bei selbstlimitierendem und chronischem Verlauf einer Hepatitis B-Infektion.

Details sind in den Abschnitten 1.9.2 und 1.9.3 erläutert (nach Michel *et al.*, 2001, modifiziert).

1.9.2 Humorale Immunantwort nach HBV-Infektion

Immunogene Bereiche zur Induktion spezifischer antikörperproduzierender B-Zellen wurden bislang auf allen viralen Antigenen, mit Ausnahme des HBxAg, identifiziert.

Neutralisierende Antikörper, die gegen die HBV-Hüllproteine gerichtet sind (anti-HBs), spielen eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung des Virus und vermitteln zugleich den Schutz vor einer Reinfektion. Anti-HBs komplexiert freie Virionen und durch die Entfernung dieser Immunkomplexe aus der Zirkulation wird die Infektion weiterer suszeptibler Zellen unterbunden.

Vermutlich besteht auch ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Immunkomplexe und den Symptomen des Prodromalstadiums sowie den späteren extrahepatischen Symptomen, die mit einer HBV-Infektion verbunden sind (Chisari, 1997). Die Rolle der gegen das Nukleokapsid gerichteten Antikörper ist dagegen nicht völlig geklärt. Es gilt als gesichert, daß diesen Antikörpern keine neutralisierende Funktion zukommt, da sie sowohl bei Patienten mit akuter als auch mit chronischer Infektion in hohen Titern nachweisbar sind. Bezüglich der T-Zell-Abhängigkeit der anti-HBc-Produktion besteht jedoch eine Diskrepanz zum HBsAg. Da in chronischen Virusträgern zwar hohe anti-HBc-Titer, jedoch nur eine gering ausgeprägte zelluläre Immunantwort gegen das HBcAg gefunden werden -im Gegensatz zur akuten Hepatitis, bei der humorale und zelluläre Immunantwort gegen HBcAg korrelieren- läßt dies vermuten, daß das HBcAg sowohl als ein T-Zell-abhängiges als auch T-Zell-unabhängiges Antigen fungiert (Milich und McLachlan, 1986).

Für die Polymerase existieren nur wenige verlässliche Daten hinsichtlich ihrer Rolle in der humoralen Immunabwehr. Antikörper gegen die virale Polymerase, speziell gegen die RNase H-Domäne, können in vielen Fällen nachgewiesen werden und gelten als diagnostischer Marker für eine anhaltende virale Replikation (Weimer *et al.*, 1990).

1.9.3 Zelluläre Immunantwort nach HBV-Infektion

T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr, indem sie ausgehend von naiven T-Zellen, nach Kontakt mit einem Fremdanigen zu Effektorzellen differenzieren. Anhand ihrer Funktion und ihres Phänotyps lassen sich T-Lymphozyten in drei verschiedene Subpopulationen unterteilen (Tab. 1-3).

T-Zellen erkennen virale Antigene in Form von kurzen Peptidfragmenten, die in Verbindung mit spezifischen MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert werden. MHC-Moleküle sind membranständige Glykoproteine auf der Zelloberfläche, deren exponierter Bereich eine peptidbindende Furche aufweist. Man unterscheidet zwei Arten von MHC-Molekülen, MHC Klasse I und MHC Klasse II.

MHC Klasse I-Moleküle binden Peptide aus Proteinen, die im Cytosol abgebaut wurden (endogene Prozessierung) und präsentieren diese Peptidfragmente $CD8^{+}$ -zytotoxischen T-Zellen. MHC Klasse II-Moleküle hingegen präsentieren Peptide im Zusammenhang mit $CD4^{+}$ -T-Zellen. Diese Peptide entstammen Antigenen, die in einem endosomal/lysosomalen Antigenprozessierungsweg degradiert wurden (exogene Prozessierung).

T-Zellen erkennen die durch MHC-Moleküle präsentierten Fremdanigene mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors. Dieser besteht aus einer α - und einer β -Kette, die zusammen die Antigenerkennung vermitteln. Mit vier weiteren Ketten bilden diese den CD3-Komplex, der für die Signalübertragung nach Bindung des MHC-Peptid-Komplexes zuständig ist. Die T-Zell-Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 fungieren zusätzlich als Corezeptoren, die während der Antigenerkennung an definierte Bereiche des MHC Klasse II- bzw. Klasse I-Moleküls der APZ binden und dadurch die Signalübertragung unterstützen. Dieser komplexe Mechanismus der spezifischen Antigenerkennung führt schließlich über eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden zur Differenzierung, Proliferation und Induktion der Effektorfunktion der jeweiligen T-Zelle.

HBV-spezifische T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Infektion. Zum einen sind sie in der Lage virusinfizierte Zellen zu erkennen und durch direkte Wechselwirkung abzutöten, zum anderen durch Ausschüttung antiviraler Zytokine die virale Genexpression in diesen Zellen zu unterdrücken, ohne sie weiter zu schädigen (Chisari, 1997).

Die Stärke und Spezifität der T-Zellantwort in der Leber und im peripheren Blut chronischer Virusträger unterscheidet sich dabei grundlegend von den Verhältnissen während und nach einer akuten selbstlimitierenden HBV-Infektion (siehe Abb. 1-9).

Tabelle 1-3: Funktionale Klassen von T-Lymphozyten

T-Zell-Subpopulation	Effektorfunktion	Phänotyp
Th1	Makrophagen-Aktivierung; Produktion von IL-2, IFN- γ , TNF- α	CD4 ⁺
Th2	B-Zell-Aktivierung; Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL- 13	CD4 ⁺
CTL	Lyse virusinfizierter Zellen; Produktion von IL-2, IFN- γ ,	CD8 ⁺

1.9.3.1 MHC Klasse II-restringierte T-Zellantwort

Wie aus Abbildung 1-9 ersichtlich, wird bei einer akuten selbstlimitierenden Infektion eine starke, multispezifische MHC Klasse II-restringierte Immunantwort gegen HBcAg und HBeAg induziert, nicht jedoch gegen HBsAg. Es wird vermutet, daß die T-Zellantwort gegen die Hüllproteine bereits sehr früh im Verlauf der Infektion, möglicherweise bereits in der präklinischen Phase, auftritt.

Zu beachten ist dabei auch die Tatsache, daß nach einer Hepatitis B-Impfung durchaus eine starke T-Zellantwort gegen das Hüllprotein induziert werden kann. Unter den bekannten T-Zell-Epitopen des HBc/HBeAg induziert das Epitop HBcAg 50-69 bei akuten, selbstlimitierenden Infektionen bei einer Vielzahl von Patienten, unabhängig von deren MHC-Typ, eine spezifische T-Zellantwort. Da dies bei chronischen Virusträgern nicht der Fall ist, wird für dieses Epitop ein kausaler Zusammenhang zwischen Virus-Eliminierung und T-Zellantwort vermutet (Ferrari *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1991).

Im Verlauf der chronischen Infektion ist die zelluläre Immunantwort deutlich schwächer ausgeprägt und nur gegen einige wenige Epitope gerichtet. Sie reicht somit nicht aus, um die Infektion wirksam zu kontrollieren und das Virus zu eliminieren. Vielmehr ist sie die Ursache für die mit einer chronischen Infektion einhergehenden, dauerhaften Leberschädigung (Chisari, 1997).

1.9.3.2 MHC Klasse I-restringierte T-Zellantwort

HBV-spezifische zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) sind hauptsächlich verantwortlich für die Reduktion der Viruslast im infizierten Gewebe. Neben dem klassischen Weg der Zell-Lyse sind diese CTL jedoch auch in der Lage die Expression viraler Gene und die Replikation des HBV-Genoms in den infizierten Hepatozyten zu beeinflussen, ohne dadurch die Zelle abzutöten (Guidotti *et al.*, 1994). Durch die Inhibition der Transkription sinkt die Konzentration an Struktur- und Nichtstrukturproteinen sowie die Zahl der replikativen Intermediate (Guidotti *et al.*, 1996).

Bezüglich der Immundominanz der einzelnen viralen Proteine besteht ein signifikanter Unterschied zur MHC Klasse II-restringierten zellulären Immunantwort. Während für das HBcAg bislang nur zwei MHC Klasse I-restringierte Epitope charakterisiert wurden, sind für das HBsAg 11 Epitope bekannt (Barnaba *et al.*, 1992; Nayersina *et al.*, 1993; Chisari und Ferrari 1995; Chisari, 1997).

Zusätzlich zu endogen synthetisiertem HBsAg kann auch exogenes (über Endosomen eingeschleustes) HBsAg über den MHC Klasse-I-Weg prozessiert und präsentiert werden (Barnaba *et al.*, 1990). Somit werden im Fall des HBsAg beide Wege der Antigenpräsentation genutzt, was letztendlich auch die ungewöhnlich stark ausgeprägte CTL-Antwort während der akuten Phase der Infektion erklärt.

1.10 Varianten des Hepatitis B-Virus und ihre Rolle in der Immunpathogenese

1.10.1 Natürlich auftretende Virus-Varianten

Die genetische Variabilität des Hepatitis B-Virus ist im Vergleich zu anderen DNA-Viren sehr hoch. Die Ursache hierfür liegt zum einen in der hohen viralen Replikationsrate, zum anderen in der hohen Fehlerrate des Schlüsselenzyms der HBV-Replikation, der Reversen Transkriptase. Dennoch ist, verglichen mit anderen Viren, die diesen Replikationsmechanismus verwenden (z. B. HIV), die Mutationsrate von HBV insgesamt betrachtet gering. Ursache hierfür ist die Anordnung des Virusgenoms in überlappenden Leserahmen, wodurch viele der auftretenden Mutationen zu letalen Virusnachkommen führen, die sich im Wirtsorganismus nicht manifestieren können (Girones *et al.*, 1989).

Bislang identifizierte natürlich vorkommende HBV-Varianten weisen Mutationen in allen Genen und regulatorischen Elementen auf (Carman *et al.*, 1993; Koff, 1994). Die zentrale Fragestellung bei der Untersuchung derartiger HBV-Varianten ist dabei die Auswirkung auf generelle Präventionsstrategien, wie z. B. die aktive Immunsierung.

Das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) als Bestandteil der Virushülle (und als einziger antigener Bestandteil der derzeit verwendeten rekombinanten HBV-Vakzine) gilt für die Immunabwehr als wichtigster Angriffspunkt. Da die Eradikation des Erregers mittels breit angelegter Impfprogramme durchaus möglich ist, muß gewährleistet sein, daß diese Vakzine auch im Fall von HBsAg-Varianten einen zuverlässigen Schutz vermittelt. HBsAg-Varianten, die die Immunprophylaxe möglicherweise unterlaufen könnten (sog. *immune-escape*-Varianten), sind in den letzten Jahren vermehrt Kernpunkt zahlreicher Untersuchungen. Neben natürlich vorkommenden Virus-Varianten sind hierbei auch die unter dem Selektionsdruck bei passiver Immunisierung entstehenden Varianten zu berücksichtigen.

1.10.1.1 Humorale *immune-escape*-Varianten

Als Prototyp der *immune-escape*-Varianten gilt sicherlich die durch Carman erstmals beschriebene Arginin 145-Variante, die an Aminosäureposition 145 im sHBsAg einen Austausch von Glycin zu Arginin aufweist. Diese Aminosäuresubstitution verursacht die Änderung eines konformationellen B-Zell-Epitops, gegen das im Zuge der humoralen Immunantwort neutralisierende Antikörper gebildet werden.

Zunächst wurde diese Variante bei Kindern HBeAg-positiver Mütter beobachtet, die sich trotz aktiv/passiver Immunisierung mit HBV infizierten (Carman *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1992; Hino *et al.*, 1995). Im folgenden wurde diese Mutante vermehrt auch im Zusammenhang mit HBV-induzierten Lebertransplantationen und damit verbundener passiver Immunprophylaxe, beobachtet (McMahon *et al.*, 1992; Schätzl *et al.*, 1997; Protzer-Knolle *et al.*, 1998). Mittlerweile ist eine Reihe von weiteren Aminosäureaustauschen im Bereich der a-Determinante beschrieben, die mit dem Versagen der passiven Immunprophylaxe in Verbindung gebracht werden (Harrison *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1994; Chiou *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1999).

1.10.1.2 Zelluläre *immune-escape*-Varianten

Eine Beeinflussung der zellulären Immunantwort durch veränderte stimulatorische Kapazität von T-Zell-Epitopen würde für das Virus einen großen Selektionsvorteil bedeuten und die Persistenz derartiger Virusmutanten im Wirtsorganismus begünstigen.

Mutationen essentieller Ankerpositionen innerhalb eines immunogenen Peptides können zu einer veränderten Antigenpräsentation durch die korrespondierenden MHC-Moleküle führen. Desweiteren können Aminosäuresubstitutionen auch Positionen betreffen, die für die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch T-Helferzellen nötig sind und die Bildung des trimolekularen Komplexes aus Peptid, MHC-Molekül und T-Zell-Rezeptor beeinträchtigen. Veränderte Peptid-Liganden mit verminderter

oder fehlender stimulatorischer Kapazität können zudem als Antagonisten von natürlichen antigenen Peptiden die T-Zellantwort blockieren (Bertoletti *et al.*, 1994a).

Neben Aminosäureaustauschen im Bereich der Antikörperbindungsstellen wurden bei Sequenzanalysen von HBV-Isolaten auch zahlreiche Mutationen innerhalb immunogener Epitope gefunden, die für die zelluläre Immunantwort verantwortlich sind (Hosono *et al.*, 1995; Tai *et al.*, 1997). Eine effiziente zelluläre Immunantwort mit der Aktivierung von CTL ist eine wichtige Voraussetzung für die Virus-Eliminierung im Zuge einer selbstlimitierenden Hepatitis B-Infektion. Zudem ist die Aktivierung von CD4⁺-T-Helferzellen für eine adäquate Stimulation von spezifischen B-Zellen und damit für die Bildung von spezifischen Antikörpern notwendig.

Für das Hepatitis B-Core-Protein (HBcAg) konnte bereits gezeigt werden, daß Aminosäureaustausche innerhalb eines immunodominanten T-Zell-Epitops die Bindungsaffinität dieser Epitop-Variante an das entsprechende MHC-Molekül ebenso wie die Erkennung durch den T-Zell-Rezeptorkomplex vermindern und somit die zelluläre Immunantwort entscheidend verändern können (Bertoletti *et al.*, 1994a; Bertoletti *et al.*, 1994b).

1.11 Ziel der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit charakterisiert die zelluläre Immunantwort nach HBV-Grundimmunisierung, speziell die Auswirkungen natürlich auftretender Virus-Varianten des Hepatitis B-Oberflächenantigens (HBsAg) auf die Wirksamkeit der Vakzine-induzierten Immunabwehr.

Die Kombination aus zellulärer und humoraler Immunantwort ist von entscheidender Bedeutung für die Wirksamkeit einer Vakzine.

Die humorale Immunantwort auf eine Infektion beinhaltet die Bildung von Antikörpern durch B-Lymphozyten, die Bindung dieser Antikörper an das korrespondierende Pathogen und die Eliminierung durch akzessorische Zellen des Immunsystems. Die zelluläre Immunantwort induziert T-Lymphozyten mit unterschiedlichen Effektorfunktionen. Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen Virus-infizierte Zellen und eliminieren diese, T-Helferzellen sind für die Aktivierung von B-Zellen und die Antikörperproduktion essentiell. T-Zellen kontrollieren somit durch Wechselwirkung mit ihren Zielzellen alle bekannten Effektormechanismen der adaptiven Immunabwehr.

Zur Prophylaxe einer Hepatitis B-Infektion steht ein rekombinanter Impfstoff zur Verfügung, der das HBsAg in Form von subviralen Partikeln enthält. Die HBV-Vakzine induziert bei einem Großteil der Geimpften eine protektive humorale Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern (anti-HBs).

In den letzten 10 Jahren wurde jedoch eine Reihe von HBV-Varianten charakterisiert, die zumindest theoretisch diesen Impfschutz unterlaufen können (sog. *humorale immune-escape*-Varianten). Ursache hierfür sind Mutationen innerhalb relevanter B-Zell-Epitope, die zu Virus-Varianten mit veränderten Antikörperbindungsstellen führen.

Die hohe Variabilität des Hepatitis B-Virus erstreckt sich auch auf Epitope der zellulären Immunantwort. Bislang ist nicht bekannt, inwieweit natürlich vorkommende

Varianten von T-Helferzell-Epitopen die durch HBV-Impfung induzierte T-Zellantwort beeinflussen.

Mutationen in T-Zell-Epitopen, die zu veränderten Bindungseigenschaften der entsprechenden Peptide führen, können sowohl die Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle als auch die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch spezifische T-Zellen beeinträchtigen. Die Auswirkungen einer fehlenden Aktivierung der zellvermittelten Immunabwehr auf die T-zellabhängige humorale Immunantwort ist ein zusätzlicher Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit.

In einem ersten Schritt sollte zunächst an einem Kollektiv HBV-grundimmunisierter Spender die impfinduzierte zelluläre Immunantwort untersucht werden, insbesondere welche funktionalen Klassen von T-Lymphozyten (CTL, T-Helferzellen) an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind und mit welcher Häufigkeit die einzelnen T-Zellpopulationen auftreten. Eine weitere Zielsetzung in diesem Zusammenhang war die Etablierung eines neuen sensitiven Testsystems zur Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen unter Vermeidung zeitintensiver Restimulationszyklen.

Die Charakterisierung der impfinduzierten zellulären Immunantwort auf die in der Vakzine vorliegende Proteinsequenz des HBsAg bildet die Grundlage für die Identifizierung von natürlich vorkommenden Epitop-Varianten mit veränderter Immunogenität. Eine Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist die Kenntnis der natürlichen Variabilität des HBsAg. Durch Analyse des bislang bekannten Sequenzdatenmaterials sollten Art und Häufigkeit von Mutationen in bekannten T-Helferzell-Epitopen charakterisiert werden.

Die Kernfrage dieser Arbeit war, inwieweit einzelne Aminosäureaustausche in immunogenen Epitopen die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung beeinträchtigen und in welchem Ausmaß in der Folge auch die humorale Immunantwort davon betroffen ist. Die Relevanz einzelner Mutationen kann dabei durch direkten Vergleich zwischen dem veränderten Epitop und der Wildtyp-Peptidsequenz in immunologischen Untersuchungen erfaßt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probanden-Kollektiv

Das Kollektiv der in dieser Arbeit untersuchten Probanden beinhaltet zum Großteil Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und zusätzlich Teilnehmer einer am Institut durchgeführten HBV-Impfstudie. Bei allen Spendern handelt es sich um freiwillige, gesunde Personen im Alter von 18-55 Jahren, die gegen Hepatitis B geimpft waren oder im Laufe der Studie geimpft wurden.

2.1.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Heterohybridom-Zelllinien PE 1-1 (ATCC HB-9234) und ZM 1-2 (ATCC HB-9192) produzieren monoklonale Antikörper gegen das Hepatitis B-Oberflächenantigen (anti-HBs) und wurden im anti-HBs-Elispot als Positivkontrollen verwendet.

2.1.3 Antigene und Mitogene

Zur spezifischen Stimulation von T-Zellen wurde rekombinantes Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg; Biotrend, Köln), als Kontrollantigen zur Abgrenzung unspezifischer Reaktionen bovines Serum-Albumin (BSA) verwendet. Polyklonale Mitogene, wie Phytohämagglutinin (PHA-P; Sigma, Deisenhofen) und *Pokeweed Mitogen* (PWM; Biochrom, Berlin) dienten als Positivkontrollen.

2.1.4 Antikörper zur Untersuchung der HLA-Restriktion

Die Restriktion HBsAg-spezifischer T-Zellpopulationen wurde in Inhibitionsversuchen mit Hilfe nachfolgender Antikörper charakterisiert.

Tabelle 2-1: Antikörper für Blockierungsversuche

Bezeichnung	Verwendung
W6/32	Blockierung MHC Klasse I ^a
CR3/43	Blockierung MHC Klasse II ^a
HLA-DP	Blockierung HLA DP-Antigen ^b
HLA-DQ	Blockierung HLA DQ-Antigen ^b
HLA-DR	Blockierung HLA DR-Antigen ^b

Bezugsquelle: ^a Dako, Hamburg; ^b Pharmingen, Heidelberg

2.1.5 Synthetische Peptide

2.1.5.1 Peptidsynthese

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene synthetisiert. Die Synthese erfolgte nach der F-moc (*Fluorenylmethoxycarbonyl*)-Methode mit einem 9050 PepSynthesizer (Milligen, Eschborn). Die Peptid-Reinigung erfolgte mittels HPLC (Pharmacia, Uppsala, Schweden), wonach die Peptide als Amine vorlagen.

2.1.5.2 Einsatz der Peptide zur Stimulation von T-Zellen

Alle Peptide lagen nach der Synthese in lyophilisiertem Zustand vor. Sie wurden in einer Konzentration von 4 mg/ml in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen) gelöst und in 100 µl Aliquots bei –20 °C gelagert. Um konstante

Bedingungen bei der Stimulation zu gewährleisten, wurde jeder Stimulationsansatz frisch angesetzt, bereits aufgetaute Peptid-Aliquots nicht erneut eingefroren und nicht benötigte Restmengen verworfen.

2.1.5.3 Peptide zur Untersuchung der impfinduzierten zellulären Immunantwort

Peptide, deren Aminosäuresequenz der des HBV-Impfantigens (HBsAg Serotyp adw2, *accession number* JQ 1575, PIR-Datenbank) entspricht, werden im folgenden als Wildtyp-Peptide bezeichnet. Alle bekannten Datenbankeinträge wurden dahingehend untersucht, ob die beschriebenen HBsAg-Sequenzen Aminosäureaustausche in bekannten T-Helferzell-Epitopen aufweisen. Neben bereits veröffentlichtem Datenmaterial wurde bei der Suche auch auf eigene Sequenzdaten zurückgegriffen. Diese Daten sind mittlerweile in einer entsprechenden Datenbank (*GenBank, National Center for Biotechnology*, Bethesda, USA) aufgenommen (Weinberger, 2000).

Zur Untersuchung der impfinduzierten Immunantwort wurden vier Peptide mit der Sequenz der in der Literatur beschriebenen CD4⁺-T-Helferzell-Epitope synthetisiert (Tab. 2-2). Die Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide entspricht dabei der des im Impfstoff enthaltenen Hepatitis B-Oberflächenantigens (HBsAg Typ adw2, *accession number* JQ 1575, PIR-Datenbank).

Tabelle 2-2: Bekannte T-Helferzell-Epitope innerhalb des HBsAg

Bezeichnung	Position im HBsAg	Aminosäuresequenz	Referenz
P1wt	16-33	Q A G F F L L T R I L T I P Q S L D	Celis <i>et al.</i> , 1988; Honorati <i>et al.</i> , 1997
P2wt	136-155	S C C C T K P T D G N C T C I P I P S S	Honorati <i>et al.</i> , 1997
P3wt	163-174	W E W A S V R F S W L S	Honorati <i>et al.</i> , 1997
P4wt	213-226	L P L L P I F F C L W V Y I	Honorati <i>et al.</i> , 1997

2.1.5.4 Überlappende Peptide zur Charakterisierung von T-Helferzell-Epitopen

Zur Identifizierung von T-Helferzell-Epitopen innerhalb des HBsAg wurden 21 jeweils um 10 Aminosäuren überlappende Peptide synthetisiert. Diese Peptide mit einer Länge von 20 Aminosäuren decken dabei die gesamte Länge des HBsAg ab (Tab. 2-3). Die den Peptiden zugrundeliegende Sequenz des HBsAg entspricht der des Impfantigens (HBsAg Typ adw2, *accession number* JQ 1575, PIR-Datenbank).

Tabelle 2-3: Überlappende Peptide

Bezeichnung	Position im HBsAg	Aminosäuresequenz
S 1	1-20	MENITSGFLGPLPVLQAGFF
S 2	11-30	PLPVLQAGFFLLTRILTIPQ
S 3	21-40	LLTRILTIPQSLDSWWTSLN
S 4	31-50	SLDSWWTSLNFLGGSPVCLG
S 5	41-60	FLGGSPVCLGQNSRSPTS NH
S 6	51-70	QNSRSPTS NH SPTSCPPICP
S 7	61-80	SPTSCPPICPGYRWMCLRRF
S 8	71-90	GYRWMCLRRFIIFLLFILLLC
S 9	81-100	IIFLLFILLLC LIFLLVLLDY
S 10	91-110	LIFLLVLLDYQGMLPVCPLI
S 11	101-120	QGMLPVCPLILGSTTTSTGP
S 12	111-130	LGSTTTSTGPCKTCTTPAQQ
S 13	121-140	CKTCTTPAQQNSMFPSCCCT
S 14	131-150	NSMFPSCCCTKPTDGNCTCI
S 15	141-160	KPTDGNCTCIPISSWAF AK
S 16	151-170	PISSWAF AKYLWEWASVRF
S 17	161-180	YLWEWASVRF SWLSLLVPFV
S 18	171-190	SWLSLLVPFVQWFVGLSPTV
S 19	181-200	QWFVGLSPTVWLSAIWMMWY
S 20	191-210	WLSAIWMMWYWGPSLYSIVS
S 21	201-221	WGPSLYSIVSSFIPLLPIFF

2.1.5.5 Peptide mit Alaninsubstitution zur Bestimmung von Ankerpositionen der Epitope P1wt und P4wt

Zur Bestimmung von essentiellen Ankerpositionen innerhalb der untersuchten Epitope wurden sukzessive Aminosäureaustausche in die entsprechenden Peptide eingeführt (Tab. 2-4 und 2-5).

Tabelle 2-4: Alaninsubstituierte P1-Varianten*

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
P1wt	QAGFFLLTRILTIPQSLD
Ala16	A AGFFLLTRILTIPQSLD
Ala18	QA A FFLLTRILTIPQSLD
Ala19	QAG A FLLTRILTIPQSLD
Ala20	QAGF A LLTRILTIPQSLD
Ala21	QAGFF A LTRILTIPQSLD
Ala22	QAGFFL A TRILTIPQSLD
Ala23	QAGFFLL A RILTIPQSLD
Ala24	QAGFFLLT A ILTIPQSLD
Ala25	QAGFFLLTR A LTIPTQSLD
Ala26	QAGFFLLTRI A TIPQSLD
Ala27	QAGFFLLTRIL A IPQSLD
Ala28	QAGFFLLTRILT A PQSLD
Ala29	QAGFFLLTRILTI A QSLD
Ala30	QAGFFLLTRILTIP A SLD
Ala31	QAGFFLLTRILTIPQ A LD
Ala32	QAGFFLLTRILTIPQS A D
Ala33	QAGFFLLTRILTIPQSL A

* Alaninsubstitution rot markiert

Tabelle 2-5: Alaninsubstituierte P4-Varianten*

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
P4wt	L P L L P I F F C L W V Y I
Ala213	A P L L P I F F C L W V Y I
Ala214	L A L L P I F F C L W V Y I
Ala215	L P A L P I F F C L W V Y I
Ala216	L P L A P I F F C L W V Y I
Ala217	L P L L A I F F C L W V Y I
Ala218	L P L L P A F F C L W V Y I
Ala219	L P L L P I A F C L W V Y I
Ala220	L P L L P I F A C L W V Y I
Ala221	L P L L P I F F A L W V Y I
Ala222	L P L L P I F F C A W V Y I
Ala223	L P L L P I F F C L A V Y I
Ala224	L P L L P I F F C L W A Y I
Ala225	L P L L P I F F C L W V A I
Ala226	L P L L P I F F C L W V Y A

* Alaninsubstitution rot markiert

2.1.5.6 Peptide zur Frequenz-Bestimmung CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL) an der zellulären Immunantwort nach einer HBV-Grundimmunisierung wurden in der Literatur beschriebene CD8⁺-Epitope in Form synthetischer Peptide im IFN- γ -Elispot eingesetzt (Tab. 2-6).

Tabelle 2-6: CTL-Epitope

Bezeichnung	Lage in HBsAg	Aminosäuresequenz	Referenz
CTL 1	14-22	VLQAGFFLL	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 2	20-28	FLLTRILTI	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 3	41-49	FLGGSPVCL	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 4	88-96	LLCLIFLLV	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 5	97-105	LLDYQMLPV	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 6	172-180	WLSLLVPFV	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 7	185-194	GLSPTVWLSA	Chisari <i>et al.</i> , 1995
CTL 8	207-216	SIVSSFIPLL	Chisari <i>et al.</i> , 1995

2.1.5.7 Kontroll-Peptide

Die Charakterisierung unspezifischer T-Zellreaktionen erfolgte durch Verwendung eines HIV-Kontrollpeptids.

Tabelle 2-7: Verwendete Kontrollpeptide

Bezeichnung	Herkunft	Aminosäuresequenz	Referenz
HIV	V3-loop von HIV gp120	RIGPGRAFVTIG	Takahashi <i>et al.</i> , 1990

2.1.6 Datenbanken

Für die Suche nach Epitop-Varianten wurden die Sequenzen bislang beschriebener HBsAg-Isolate, die in der GenBank (*National Center for Biotechnology*, Bethesda, USA) hinterlegt sind, auf Aminosäureaustausche in den bekannten T-Zell-Epitopen analysiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Suspensionszellen

Die Kultur der Heterohybridom-Zelllinien erfolgte in B-Zell-Medium [BZM: *high* Glucose DMEM mit 10 % FKS [v/v], 4 mM L-Glutamin, 0,5 U/ml Penicillin und 0,5 µg/ml Streptomycin (alle Bestandteile PAN, Aidenbach)] bei horizontaler Lagerung in 175 cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) in einem Volumen von 100 ml in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37 °C. Zur Passagierung wurden die Zellen bei Erreichen der maximalen Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml auf eine Dichte von ca. 2×10^5 Zellen/ml mit frischem BZM verdünnt.

Periphere Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden in T-Zell-Medium [TZM: RPMI 1640 mit 10 % Humanserum [v/v], 2 mM L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren (8,9 mg/l Alanin, 15 mg/l Asparagin, 13,3 mg/l Asparaginsäure, 14,7 mg/l Glutaminsäure, 7,5 mg/l Glycin, 11,5 mg/l Prolin, 10,5 mg/l Serin), 2 mM Natriumpyruvat, 0,5 U/ml Penicillin und 0,5 µg/ml Streptomycin (alle Bestandteile PAN, Aidenbach)] in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert.

2.2.1.2 Konservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Periphere Blutlymphozyten

Frisch isolierte PBL wurden pelletiert ($300 \times g$, 4°C), in einer Konzentration von 2×10^7 PBL/ml in vorgekühltem Einfriermedium (RPMI 1640 mit 10 % [v/v] Humanserum und 20 % [v/v] DMSO) resuspendiert und 1 ml Aliquots in spezielle Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Suspensions-Zelllinien

Speziell bei den beiden Heterohybridomzelllinien ZM 1-2 und PE 1-1 erwies sich die beschriebene Vorgehensweise als äußerst zellschädigend. Einfriermedium und Abstufung der Einfriergeschwindigkeit wurden daher optimiert, um den Anteil vitaler Zellen beim Wiederauftauen zu erhöhen.

Zum Einfrieren von ZM 1-2 und PE 1-1 wurden in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Zellen für 10 min pelletiert ($300 \times g$, 4°C), in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Einfriermedium (FKS mit 20 % [v/v] DMSO, gekühlt auf 4°C) resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte in einer Styroporbox graduell zunächst für 4 h bei -20°C , anschließend über Nacht bei -70°C und abschließend in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.3 Auftauen von in flüssigen Stickstoff konservierten Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz im 37°C -Wasserbad geschwenkt, die Zellsuspension mit 20 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium vermischt (Ausverdünnung des zelltoxischen DMSO) und die Zellen pelletiert ($250 \times g$, 5 min). Nach Resuspendierung der Zellen in 5 ml TZM wurden diese für 24 h in speziellen gasdurchlässigen Periperm-Schalen (Heraeus über Zefa, München) bei einer Dichte von ca. 2×10^7 Zellen kultiviert, ehe sie in Versuchen eingesetzt oder weiterkultiviert

wurden. Diese Vorinkubation lieferte eine deutlich höhere Zahl an vitalen Zellen nach dem Auftauen und sorgte im Fall von PBL für einen signifikant geringeren unspezifischen Hintergrund in den Elispot-Versuchen.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge einer 0,5 %igen Trypanblaulösung (Merck, Darmstadt) vermischt. Tote Zellen erscheinen durch den in die Zellmembran eindringenden Farbstoff blau und können so von vitalen, transparenten Zellen unterschieden werden.

2.2.2 Arbeiten mit peripheren Blutlymphozyten (PBL)

2.2.2.1 Gewinnung von PBL

PBL wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut (Heparin-Endkonzentration: 25 IU/ml) gewonnen. Hierfür wurde in speziellen 50 ml Leucosep-Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) 15 ml Ficoll (PAN, Aidenbach) vorgelegt und mit Vollblut (2:1 mit PBS verdünnt) überschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation (30 min, $800 \times g$, Ausschwingrotor, Raumtemperatur) erfolgte eine Auftrennung in Plasma, Lymphozytenpopulation und Erythrozyten. Die gewünschte Lymphozytenpopulation wurde abgezogen und in ca. 30 ml PBS zweimal gewaschen. Die Sedimentation der Zellen erfolgte jeweils durch kurze Zentrifugation (5 min, $250 \times g$, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde abschließend in TSM aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und die Zellen entweder in den entsprechenden Versuchen eingesetzt oder zur Langzeitlagerung kryokonserviert.

2.2.2.2 Isolierung definierter Zellpopulationen aus PBL

Prinzip:

Definierte Zellpopulationen lassen sich durch ein mechanisches Verfahren (*magnetic cell sorting*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene isolieren. Die jeweiligen Zellen binden dabei mit den für sie charakteristischen Oberflächenantigenen an entsprechende monoklonale Antikörper, die wiederum an paramagnetische Partikel (sog. *microbeads*) gekoppelt sind. In einem starken Magnetfeld lassen sich die an die Partikel gebundenen Zellen von den übrigen unmarkierten Zellen über entsprechende Säulen abtrennen. Nicht-markierte Zellen passieren diese Säule und nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld kann die markierte Zellpopulation eluiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden auf diese Weise T-Helferzellen ($CD4^+$), zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$), B-Zellen ($CD19^+$) und Natürliche Killerzellen ($CD56^+$) isoliert.

Durchführung:

Frisch isolierte PBL wurden gewaschen, zentrifugiert ($300 \times g$, 10 min, $4^\circ C$) und das Zellpellet in $80 \mu l$ PBS/ 10^7 PBL resuspendiert. Die magnetische Markierung der gewünschten Zellpopulation erfolgte durch Zugabe von $20 \mu l$ Microbeads/ 10^7 PBL während einer Inkubation von 15 min bei $4^\circ C$. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal gewaschen (15 ml PBS), zentrifugiert und in $500 \mu l$ PBS aufgenommen. Für die magnetische Auftrennung wurden je nach Zellzahl MS^+ -Säulen (für max 1×10^7 markierte Zellen) oder LS^+ -Säulen (für max 1×10^8 markierte Zellen) verwendet, mit 5 ml PBS äquilibriert, die Zellsuspension aufgebracht und mit $3 \times 500 \mu l$ (MS^+ -Säulen) bzw. $3 \times 5 ml$ (LS^+ -Säulen) PBS gewaschen. Nicht-markierte Zellen passieren die Säule. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierte Zellpopulation durch Zugabe von $500 \mu l$ (MS^+ -Säulen) bzw. 5ml (LS^+ -Säulen) eluiert.

2.2.3 Immunologische Nachweismethoden

2.2.3.1 Lymphozytenproliferations-Assay

Prinzip:

Bei diesem Test wird die Fähigkeit von T-Lymphozyten untersucht, auf Stimulation mit einem spezifischen Antigen hin zu proliferieren. Hierfür werden PBL einem spezifischen Antigen ausgesetzt und nach 7 Tagen mit radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin versetzt. Die Menge an radioaktivem Thymidin, die in der Zeit in die Zellen eingebaut wird, wird abschließend gemessen und gilt als Maß für die DNA-Syntheseleistung der Gesamt-Population. Dabei gibt das Ergebnis allerdings nur ein Gesamtbild der getesteten Population wieder und erlaubt keine Aussagen über Art und Häufigkeit der reagierenden Zellen.

Durchführung:

Die antigene Stimulation der PBL (1×10^5 /Ansatz in 100 μl TZM) erfolgt in Rundboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) durch Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptid bzw. 5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem HBsAg (Endkonzentration). Die Platten werden 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Achtzehn Stunden vor Ende der Inkubation werden jedem Ansatz 50 μl einer ^3H -Thymidin-Lösung (1 μCi /Ansatz; [*methyl*- ^3H]Thymidin, 5 mCi, Amersham, Freiburg) zupipettiert. Zur Messung des eingebauten ^3H -Thymidins werden die Zellen mittels eines Zell-Harvesters (FilterMate™-Cell Harvester) auf spezielle Filterplatten überführt (UniFilter™-96 GF/C), der Boden mit Folie versiegelt (TopSeal A) und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Zugabe von je 25 μl Szintillationsflüssigkeit (Microscint™ O) werden die Platten versiegelt und vermessen (Top-Count). Alle verwendeten Geräte, Lösungen und Platten wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Packard BioScience, Dreieich bezogen. Alle Ansätze wurden jeweils in 5 Replikaten durchgeführt; Positivkontrollen wurden mit PHA

(5 µg/ml in PBS), Negativkontrollen mit HIV-Peptid (20 µg/ml in PBS) stimuliert. Die T-Zellproliferation wurde wiedergegeben in Stimulationsindices (SI), die sich wie folgt errechneten:

$$SI = \frac{\text{cpm der spezifisch stimulierten Probe}}{\text{cpm der Negativkontrolle}}$$

SI ≥ 3 gelten als positiv.

2.2.3.2 Enzyme-linked immunospot-assay

Prinzip:

Mit Hilfe des *enzyme-linked immunospot-assays* (Elispot) können antigenspezifische T-Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion detektiert werden. Im Unterschied zu Standardmethoden, wie etwa dem Chromfreisetzungstest und dem Proliferationsassay, stellt der Elispot eine schnelle und hochsensitive Testmethode dar, die eine quantitative Aussage über die Frequenz spezifischer T-Zellen erlaubt. Das Testprinzip ist eine Abwandlung des herkömmlichen *enzyme-linked immunosorbent-assays* (Elisa), mit dem Unterschied, daß die Messung der Zytokinsekretion nicht im Überstand erfolgt, sondern einzelne zytokinsezernierenden Zellen detektiert werden.

Der Elispot ist auch geeignet, um antikörpersezernierende B-Zellen zu quantifizieren. In diesem Fall wird die Membran mit Antigen beschichtet und der Nachweis erfolgt durch markierte Anti-Immunglobuline.

Durchführung:

Zytokin-Elispot

Nitrozellulosebeschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (MAHA S 45, Millipore, Eschborn) wurden mit monoklonalen, anti-human Antikörpern (alle Hölzl, Köln; siehe Tab. 2-9) beschichtet (5 µg/ml in PBS) und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde abpipettiert und die Platten viermal mit je 200 µl PBS/Ansatz gewaschen. In einem anschließenden Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von je 200 µl Blockierungspuffer (TZM mit 10 % FKS) während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C blockiert. PBL wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Ansatz in einem Volumen von 100 µl TZM/Ansatz (je 5 Replikate) eingesetzt. Die Stimulation erfolgte direkt in der Platte durch Zugabe von 50 µl Antigenlösung (Endkonzentration: HBsAg: 5 µg/ml; Peptide: 20 µg/ml). Nach einer 24stündigen Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde die Zellsuspension abgezogen und eventuell noch anhaftende Zellen durch 5maliges Waschen entfernt (je 200 µl PBS mit 0,05 % Tween 20, je 5 min Inkubation mit Waschpuffer). Danach erfolgte die Zugabe des sekundären, biotinylierten Antikörpers (1 µg/ml in PBS, je 100 µl/Ansatz); die Platten wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend gewaschen (5 mal je 200 µl PBS/Ansatz) und für weitere 2 Stunden mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (1 µg/ml in PBS; je 200 µl/Ansatz; Hölzl, Köln) inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (5 mal je 200 µl PBS/Ansatz) erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe des Enzymsubstrates NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim). Dafür wurde eine Färbelösung [200 µl NBT/BCIP-Stammlösung auf 10 ml Färbepuffer (0,1 M Tris-Puffer, pH 9,5 mit 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl)] hergestellt und jeweils 200 µl/Ansatz eingesetzt. Nach 5-10 min (spenderspezifisch) wurde die kolorimetrische Reaktion durch Waschen der Platten mit deionisiertem Wasser gestoppt. Die Auswertung der Platten erfolgte an einem Stereomikroskop (MZ 8, Leica, München). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit PHA (Endkonzentration 5 µg/ml in PBS; Sigma, Deisenhofen) stimuliert, als Negativkontrolle mit einem irrelevantem HIV-Peptid (HIV, Endkonzentration: 20 µg/ml).

Tabelle 2-9: Elispot-Antikörper*

Antikörper	Verwendung
1-D1K	IFN- γ Primärantikörper
7-B6-1	IFN- γ Sekundärantikörper
IL-4 I	IL-4 Primärantikörper
IL-4 II	IL-4 Sekundärantikörper
IL-2 I	IL-2 Primärantikörper
IL-2 II	IL-2 Sekundärantikörper
TNF- α I	TNF- α Primärantikörper
TNF- α II	TNF- α Sekundärantikörper

* Bezugsquelle: Hölzl, Köln

Anti-HBs-Elispot

Für diesen Test wurden MAIP-Platten verwendet (Millipore, Eschborn) und mit rekombinantem HBsAg (Endkonzentration: 5 μ g/ml in PBS, 100 μ l/Ansatz) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Als Sekundärantikörper wurde AP-konjugiertes anti-human IgG verwendet (1:2000 in PBS verdünnt, Inkubation 2 h bei 37 °C; Dako, Hamburg). Alle übrigen Schritte wurden analog dem Zytokin-Elispot durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden verschiedene Verdünnungsstufen der beiden anti-HBs-produzierenden Hybridom-Zelllinien PE 1-1 und ZM 1-2 (1×10^1 - 1×10^4 B-Zellen/Ansatz) verwendet, als Negativkontrolle wurden Zellen mit irrelevantem Antigen (BSA, 5 μ g/ml in PBS) stimuliert.

2.2.3.3 Mikropartikel-Enzymimmunoassay zur Bestimmung von HBsAg und HBeAg

Prinzip:

Der verwendete Test (ImX, Abbott, Wiesbaden) zum Nachweis von HBsAg und HBeAg beruht auf dem Prinzip des Mikropartikel-Enzymimmunoassays (MEIA). Dazu werden Primärantikörper-beschichtete Mikropartikel, Biotin-markierte Sekundärantikörper und die zu messende Probe in einer Inkubationskammer vermischt, worauf sich ein Antigen-Antikörper-Komplex bildet. Dieser wird irreversibel an eine Glasfibrermatrix gebunden und es erfolgt die Zugabe eines anti-Biotin-AP-gekoppelten Antikörpers sowie die Zugabe des Substrats der AP (4-Methylumbelliferyl-Phosphat). Die Geschwindigkeit, mit der sich aufgrund einer enzymatischen Reaktion ein fluoreszierendes Produkt bildet, gilt als Maß für die HBsAg- bzw. HBeAg-Konzentration in der untersuchten Probe. Als Negativ- und Positivkontrollen werden die vom Hersteller mitgelieferten Proben verwendet.

Durchführung:

Die Konzentration an HBsAg und HBeAg wurde aus den Zellkulturüberständen der Hepatozytenkulturen bestimmt. Hierfür wurden je 200 µl der durch Zentrifugation ($1000 \times g$, 5 min) geklärten, zellfreien Überstände in den Test eingesetzt. Während im Fall des HBsAg eine quantitative Analyse erfolgte, konnte HBeAg (mangels rekombinantem HBeAg zur Festlegung einer Eichkurve) nur semi-quantitativ bestimmt werden.

2.2.3.4 Durchflußzytometrie

Prinzip:

Die Durchflußzytometrie wurde in dieser Arbeit für die Identifizierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene verwendet. Hierfür werden Zellen mit Antikörpern markiert, die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Die Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, so daß ein Strom einzelner Zellen entsteht, der dann von einem Laserstrahl erfaßt wird. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und die Granularität einer Zelle darstellt sowie die Emission der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die parallele Untersuchung mehrerer Oberflächenmarker. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Weise die Reinheit depletierter bzw. angereicherter Zellpopulationen überprüft.

Durchführung:

Für die Analyse wurden 5×10^6 Zellen (in TZM) in spezielle Polystyrolröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, zentrifugiert (5 min, $800 \times g$ bei 4°C), der Überstand abgezogen und die Zellen in 5 ml gekühltem PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, $800 \times g$ bei 4°C) erfolgte die Fixierung der Zellen in 2 ml Paraformaldehyd (2 % in PBS; 30 min auf Eis). Nach Pelletierung der Zellen wurde die Fixierlösung abgezogen, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in 250 μl Färbelösung resuspendiert (Fluorescein-gekoppelter Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt, siehe Tab. 2-10) und für 1 h bei 4°C inkubiert. Um den Abbau des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern erfolgten alle Schritte ab hier im Dunkeln durch Umwickeln der Röhrchen mit Alufolie. Für die Analyse im FACScan-Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Zellen abschließend gewaschen, zentrifugiert und in 500 μl PBS aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der *Cell-Fit-Software*.

Tabelle 2-10: Antikörper für die Durchflußzytometrie *

Bezeichnung	Verwendung
Monoclonal Maus anti-Human CD8; FITC-konjugiert	Nachweis von zytotoxischen T-Zellen
Monoclonal Maus anti-Human CD4; FITC-konjugiert	Nachweis von T-Helferzellen
Monoclonal Maus anti-Human CD19; FITC-konjugiert	Nachweis von B-Zellen
Monoclonal Kaninchen anti-Maus IgG; FITC-konjugiert	Kontroll-Antikörper

* Bezugsquelle: Dako, Hamburg

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 Isolierung viraler Nukleinsäure

Virale DNA wurde mit Hilfe des *QiaAmp Blood and Tissue Kit* (QuiaGen, Hilden) aus Zellkulturüberständen präpariert. Je 200 µl der durch Zentrifugation ($6500 \times g$, 1 min) geklärten, zellfreien Überstände wurden mit 400 µl des Puffers AL sowie 25 µl Proteinase K (30 mg/ml in H₂O) versetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde durch Zugabe von 400 µl 2-Propanol die Löslichkeit der DNA soweit erniedrigt, daß diese bei der anschließenden Zentrifugation ($6500 \times g$, 1 min) an die eingepaßte Membran der Reaktionsgefäße (sog. *spin columns*, QuiaGen, Hilden) adsorbierte. Nach zweimaligen Waschen (je 500 µl Lösung AW) wurde die DNA nach Zugabe von 100 µl eines Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch Zentrifugation ($6500 \times g$, 1 min) von der Säule eluiert .

2.2.4.2 Quantitativer Nachweis von HBV-DNA

Prinzip:

Die *TaqMan*-Technologie (Heid *et al.*, 1996) basiert auf dem Einsatz einer fluorogenen Sonde, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff -in diesem Fall FAM (6-Carboxy-fluorescein)- und am 3'-Ende mit einem passenden Quencher -hier

TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin)- markiert ist (Livak *et al.*, 1995). Diese Sonde bindet unmittelbar hinter dem 5'-Primer an den gleichen Strang wie dieser und wird bei der Verlängerung des Primers durch die einzelstrangspezifische 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut (Holland *et al.*, 1991; Lyamichev *et al.*, 1993). Die quantitative Belegung aller Einzelstränge mit Sondenmolekülen wird durch deren im Vergleich zu beiden Primern etwa 10 °C höhere Schmelztemperatur ($T_m \approx 70\text{ °C}$) gewährleistet. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung durch den Laser die absorbierte Energie von FAM intramolekular direkt auf TAMRA übertragen und es kann nur dessen relativ langwellige Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 582\text{ nm}$) detektiert werden. Erst wenn die Polymerase das Sondenmolekül während der Synthese eines Amplifikationsproduktes spaltet, werden die beiden Farbstoffe räumlich voneinander getrennt, und die FAM-Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 518\text{ nm}$ wird meßbar. Der Anstieg dieses Signals ist direkt proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes und kann im *TaqMan*-Gerät während der PCR mittels einer integrierten Glasfaseroptik durch die speziellen optischen Deckel der Reaktionsgefäße gemessen werden, ohne diese zu öffnen, womit Kontaminationen vermieden werden.

Die Verwendung von dUTP statt dTTP ermöglicht es der Uracil-N-Glycosylase (UNG) zwischen authentischer viraler DNA und kontaminierenden Amplifikaten zu unterscheiden (Delort *et al.*, 1985). Letztere werden zu Beginn der PCR in einem Inkubationsschritt von 10 min bei 50 °C enzymatisch abgebaut und stehen für die Amplifikation nicht zur Verfügung.

Durchführung:

Ein Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten (alle Perkin Elmer – Applied Biosystems, Weiterstadt):

50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM MgCl_2 ; 400 nM dUTP; 200 nM dATP; 200 nM dCTP; 200 nM dGTP; 300 nM Primer HBV-Taq 1 und HBV-Taq 2; 200 nM TaqMan-Sonde BS-1 (Tab. 2-11); 0,5 U Uracil-N-Glycosylase; 1,25 U AmpliTaq Gold DNA-Polymerase sowie 10 µl der DNA-Präparation je 50 µl Ansatz.

Nach dem Abbauschnitt von potentiell vorhandenen kontaminierenden Amplifikaten folgte der initiale Denaturierungsschritt (10 min bei 95 °C), der neben dem vollständigen Schmelzen der DNA auch die UNG inaktiviert. Das weitere Temperaturprofil entsprach nicht dem einer konventionellen PCR, da es sich um ein zweistufiges Schema handelte (Denaturierung: 15 s bei 95 °C; Hybridisierung und Kettenverlängerung: 1 min bei 60 °C; 50 Zyklen).

Tabelle 2-11: Primer und Sondensequenzen für den quantitativen DNA-Nachweis

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	GC-Gehalt	Länge	Position
HBV-Taq 1 5'-Primer	CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C	50 %	22	321-342
HBV-Taq 2 3'-Primer	ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC	43 %	23	401-379
BS-1 TaqMan-Sonde	<i>FAM</i> -TCC TCC AAT TTG TCC TGG TTA TCG CT- <i>TAMRA</i>	46 %	26	349-374

Ein spezifisches Amplifikationssignal ist durch einen steilen exponentiellen Anstieg und das Erreichen eines Plateaus kurz danach gekennzeichnet. Ein Grenzwert, der unspezifisch ansteigende Kurven ausschließt, wurde nach jedem Lauf festgesetzt, und der Zeitpunkt, an dem die untersuchte Probe diesen Grenzwert überschreitet, wird als Grenzwertzyklus (*threshold cycle*, c_t) definiert. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit neun Stufen einer Verdünnungsreihe des Plasmides pHBV991 (10^8 - 10^0 Kopien je Ansatz). Über einen weiten Bereich herrscht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Grenzwertzyklus und dem dekadischen Logarithmus der DNA-Konzentration. Daher konnten auf dieser Basis für jeden Lauf Parameter einer Regressionsgeraden bestimmt werden, die die automatisierte Umrechnung der Grenzwertzyklen unbekannter Proben in DNA-Konzentrationen erlaubten. Die Genauigkeit der so erreichten Quantifizierung konnte anhand von Verdünnungsreihen der Eurohep-Standardplasmen für die Serotypen *ad* und *ay* (Heermann *et al.*, 1999) gezeigt werden.

2.2.5 Arbeiten mit primären humanen Hepatozyten

2.2.5.1 Isolierung und Kultur primärer humaner Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Wolfgang Thasler und Herrn Dr. Thomas Weiß (Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg) aus Leberteilresektaten isoliert.

Das Verfahren orientiert sich an einer modifizierten Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik (Alpini *et al.*, 1994). Die tumorfreien und nicht zirrhotischen Resektate wurden zunächst an den zugänglichen Gefäßmündungen mit Sonden kanüliert und mit Krebs-Ringer-Puffer (KRB: 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 5 mM Glucose; 20 mM HEPES, pH 7,4; erwärmt auf 37 °C) zur Entfernung aller Blutreste perfundiert.

Nach wenigen Minuten wurde der Lösung 1 mM EGTA zugesetzt, sie wurde carbogeniert (95 % [v/v] O₂, 5 % [v/v] CO₂) und die Perfusion für 10 min fortgesetzt. Nach Spülung mit 5 mM CaCl₂ erfolgte eine Kollagenase-Behandlung (5 mM CaCl₂ und 0,05 % [w/v] Kollagenase in KBR) zum proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix und zur Lösung der Hepatozyten aus dem Gewebeverband. Nach 10-15 min (je nach Resektatgröße) wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und zur Vereinzelung der Zellen nacheinander durch zwei Nylon-Netze von 210 µm und 70 µm Porengröße gestrichen.

Während einer weiteren Inkubation im Kollagenase-haltigen KBR (3-5 min unter kräftigem Schütteln bei 37 °C), wurde anhaftendes zelluläres Material abgelöst, die Zellen anschließend sedimentiert (5 min, 23 × g) und dreimal mit einem Protein-haltigen Puffer (120 mM NaCl; 6,2 mM KCl; 0,9 mM CaCl₂; 0,2 % [w/v] BSA; 10 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen. Der Anteil vitaler Zellen in der Präparation ließ sich mittels Zentrifugation durch einen Percoll-Gradienten erheblich steigern; dazu wurden 12 ml Percoll in PBS mit 17-25 ml Zellsuspension vermischt und die Zellen für 5 min bei 76 × g und 4°C pelletiert. Nach zwei weiteren Waschschritten erhielt man Populationen von mehr als 85 % vitalen (Trypanblau-Ausschlußtest) Hepatozyten

mit weniger als 2 % nicht-parenchymalen Zellen (Größe < 10 µm, nicht-polygonale Morphologie).

Die Kultur ($1,5 \times 10^5/\text{cm}^2$) erfolgte auf einer Beschichtung aus Rattenschwanzkollagen (1 mg/ml in Kulturmedium; etwa $0,15 \text{ ml}/\text{cm}^2$ Kulturfläche) in DMEM-Medium mit 2 mM stabilem L-Glutamin, 0,5 U/ml Insulin, 7 ng/ml Glucagon, 7,5 µg/ml Hydrocortison, 0,5 U/ml Penicillin und 0,5 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Beschichtung der 6-well-Kulturplatten wurden pro Ansatz 0,5 ml der Kollagenlösung ausgebracht, die während einer Inkubation von 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ gelierte. Anschließend wurden die Platten mit Kulturmedium äquilibriert (2 ml/Ansatz, 30 min, 37 °C, 5 % CO₂). Für einen Zeitraum von 12 h nach der Isolierung erfolgte die Kultivierung unter zusätzlicher Sauerstoffbegasung (40 % O₂), die die Reoxygenierung der hypoxischen PHH beschleunigt und somit zu einer höheren Vitalitätsrate führt. Im weiteren Verlauf der Kultur wurde täglich ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.5.2 *In vitro*-Infektion primärer humaner Hepatozyten

Für die Infektion von PHH wurde Serum eines chronischen HBV-Trägers mit $4,3 \times 10^9$ Genomäquivalenten/ml verwendet. Koinfektionen mit HCV, HIV und CMV wurden ausgeschlossen. Die Infektion erfolgte mit etwa $4,5 \times 10^7$ Genomäquivalente/ml über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Das zur Infektion verwendete Kulturmedium enthielt zusätzlich zu den o.g. Komponenten noch 3,5 % [w/v] PEG, sowie 1,5 % [v/v] DMSO. Nach 16 h wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen, wobei die Waschschrte an Tag 1 nach Infektion im zeitlichen Abstand von 8 h, an Tag 2 und 3 im Abstand von 12 h und im folgenden alle 24 h durchgeführt wurden.

Die Verlaufskontrolle der Infektion erfolgte standardmäßig über einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei die Effizienz der Infektion anhand der Parameter HBsAg, HBeAg und HBV-DNA bestimmt wurde.

2.2.5.3 Beeinflussung der *in vitro*-Infektion durch Typ 1-Zytokine

Um den Einfluß von IFN- γ und TNF- α auf den Verlauf der *in vitro*-Infektion zu untersuchen, wurden rekombinantes IFN- γ und TNF- α (PAN, Aidenbach) in unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration: IFN- γ : 20 bzw. 200 U/ml; TNF- α : 100 bzw. 1000 U/ml) dem Hepatozyten-Kulturmedium zugesetzt und die Behandlung im Zuge des täglichen Mediumwechsels beibehalten. Die Zugabe der Zytokine erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten, beginnend am Tag der Infektion (t_0), ab Tag zwei der Infektion (t_2), und ab Tag 7 der Infektion (t_7). Die Auswertung erfolgte analog Punkt 2.2.5.2 anhand der Parameter HBV-DNA und HBeAg, die aus dem Zellkulturüberstand bestimmt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Immunologische Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung

In der vorliegenden Arbeit wurde die durch die Hepatitis B-Impfung vermittelte zelluläre Immunantwort an einem Kollektiv geimpfter Probanden ($n = 30$) untersucht. Parallel zu herkömmlichen Lymphoproliferationsassays sollte die Methode des *enzyme-linked immunospot-assays* (Elispot) neu etabliert und zum Nachweis HBV-spezifischer zytokinsezernierender Zellen verwendet werden.

Die Untersuchung der impfinduzierten zellulären Immunantwort wurde mit isolierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) durchgeführt, wobei das untersuchte Kollektiv der Lymphozyten-Spender aus Probanden mit unterschiedlich lang zurückliegender Impfung zusammengesetzt war (1-8 Wochen, 1-5 Jahre und ≥ 5 Jahre).

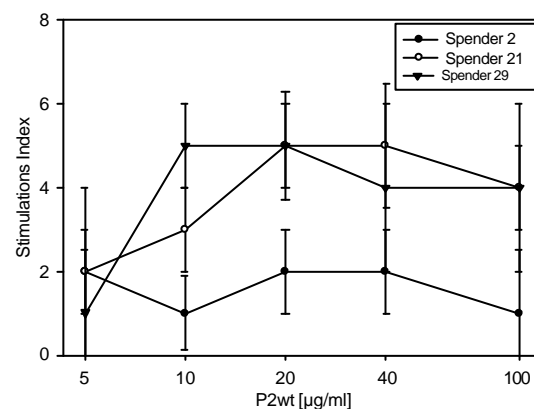
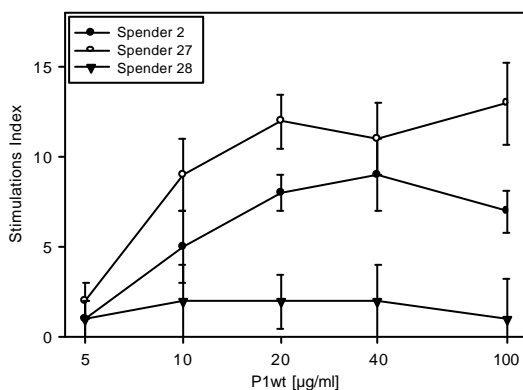
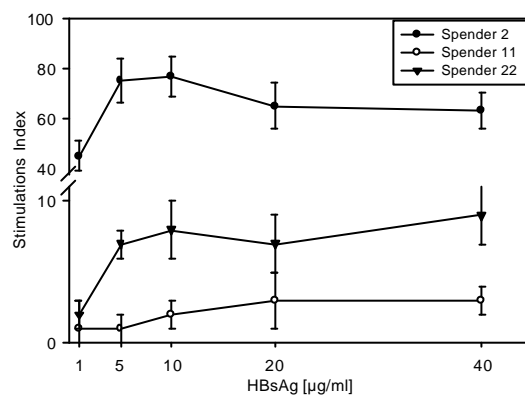
In einem ersten Schritt wurde die antigenspezifische T-Zell-Proliferation (als Maß für die spezifischen $CD4^+$ -T-Zellimmunität) HBV-spezifischer T-Lymphozyten untersucht. Der dafür verwendete Proliferationsassay erlaubt dabei jedoch keinerlei Rückschlüsse über Häufigkeit und funktionelle Fähigkeit der reaktiven T-Zellpopulation. PBL wurden mit Proteinantigen (rekombinantes HBsAg) sowie mit synthetischen Peptiden, die vier in der Literatur beschriebene $CD4^+$ -T-Helferzell-Epitope repräsentieren, stimuliert.

3.1.1 Abhängigkeit der T-Zellreaktivität von der Antigendosis

Zur Bestimmung der optimalen Antigendosis zur Induktion einer spezifischen T-Zellreaktivität wurde eine konstante Zahl von 1×10^5 PBL/Ansatz in Proliferationsassays mit steigenden Antigendosen von $1 \mu\text{g/ml}$ – $40 \mu\text{g/ml}$ (rekombinantes HBsAg) bzw. $5 \mu\text{g/ml}$ – $100 \mu\text{g/ml}$ (Peptide) stimuliert (Abb. 3-1; gezeigt sind repräsentative Ergebnisse verschiedener Spendern). Um unspezifische

Reaktionen abzugrenzen, wurden BSA (Kontrollantigen) und HIV-Peptid (Kontrollpeptid) in steigenden Konzentrationen eingesetzt.

Es zeigt sich ein typischer Sättigungsverlauf in Abhängigkeit von der Konzentration. Es fällt dabei auf, daß das HBsAg vermutlich bedingt durch seine partikuläre Form ein sehr immunogenes Antigen darstellt, das bereits in Konzentrationen von 1 µg/ml eine Immunantwort induziert, deren Optimum bei einer Antigendosis von 5–10 µg/ml liegt. Von den synthetischen Peptiden mußte eine weit höhere Dosis von 20–40 µg/ml eingesetzt werden, um eine optimale Zell-Reaktivität zu induzieren. Aufgrund dieser Vorversuche und den Angaben in der Literatur wurde für alle in dieser Arbeit gezeigten Versuche eine Konzentrationen von 5 µg/ml (HBsAg) und 20 µg/ml (Peptide) gewählt.



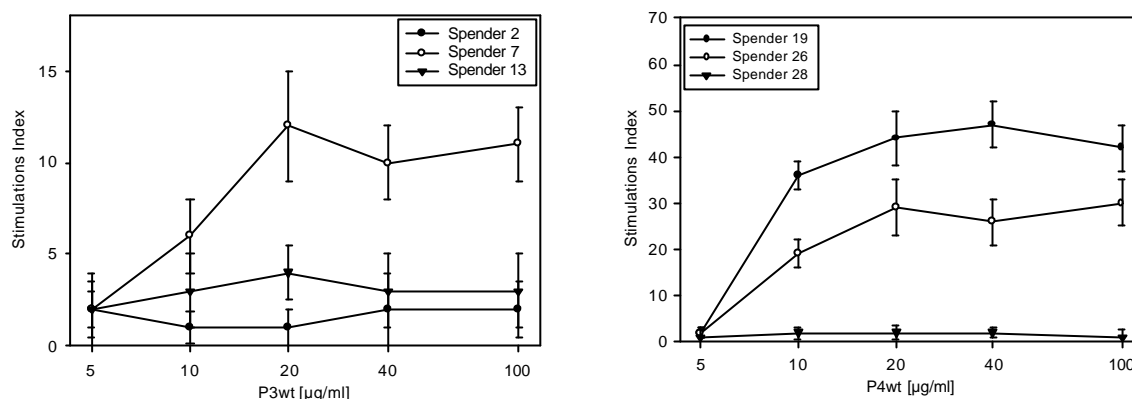


Abbildung 3-1: Abhängigkeit der proliferativen T-Zellantwort von der Antigendosis.

Zur Festlegung der optimalen Antigendosis wurden 1×10^5 PBL/Ansatz mit steigenden Konzentrationen an Gesamt-HBsAg und Peptid P1wt – P4wt stimuliert. Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimmulationsindices [SI], wobei $SI \geq 3$ als positiv gelten. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von je 3 Spendern des untersuchten Kollektivs als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde.

3.1.2 Proliferation HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten

PBL von 28 der 30 untersuchten Spender zeigten nach Stimulation mit rekombinantem HBsAg eine signifikante T-Zellproliferation (Tab. 3-1), wobei die Intensität der gemessenen T-Zellproliferation deutlich schwankte. Während im Einzelfall Stimmulationsindices von > 100 erreicht wurden, lagen die Werte anderer Spender im Grenzwertbereich von $SI = 3$. Bei den beiden Spender 11 und 18, die keine signifikante T-Zellproliferation zeigten, konnte auch durch eine Erhöhung der Antigenkonzentration keine Reaktivität induziert werden (siehe Abb. 3-1). Beide Spender verfügten jedoch trotz fehlender T-Zellreaktivität über schützende Antikörper-Titer von 300 IU/l (Spender 11) bzw. 250 IU/l anti-HBs (Spender 18).

Daß es sich bei den gezeigten T-Zell-Reaktionen um spezifische Immunantworten handelt, konnte durch Versuche mit PBL ungeimpfter, anti-HBs-negativer Spender gezeigt werden. PBL von 6 ausgewählten Spendern wurden unmittelbar vor der Grundimmunisierung untersucht. Hierbei konnte weder durch HBsAg noch durch eines der Peptide eine signifikante T-Zellproliferation induziert werden.

Bezüglich der untersuchten CD4⁺-T-Helferzell-Epitope zeigte sich, daß lediglich bei 15 der 30 Spender eine Reaktivität mittels der vier Peptid-Epitope induziert werden konnte. Auch hier war die gemessene T-Zellreaktivität in ihrer Intensität sehr variabel; im Mittel wurden Stimulationsindices von 12 ± 3 (P1wt), 5 ± 0 (P2wt), 7 ± 3 (P3wt) und 27 ± 17 (P4wt) gemessen. Bei Spendern, die keine Reaktion auf eines der Peptide zeigten, konnte dies auch durch eine sehr hohe Peptidkonzentration von 100 µg/ml nicht induziert werden (siehe Abb. 3-1).

Die Stimulation mit den Peptiden P1wt und P4wt induzierte bei je 10 Spendern eine Lymphozytenproliferation, während bei Verwendung von Peptid P2wt und P3wt nur 2 bzw. 5 von 30 Geimpften eine Reaktivität zeigten. Zusammen mit den oben erwähnten mittleren Stimulationsindices, die für P1wt und P4wt deutlich höher sind, sprechen die Versuche für eine Immundominanz der beiden Epitope P1wt und P4wt, wobei P4wt durch signifikant hohe Werte auffiel.

Die Tatsache, daß bei 13 Spendern, die eine deutliche Reaktion auf das Gesamt-Antigen zeigten, keines der 4 Peptide eine T-Zellreaktivität induzieren konnte, ließ vermuten, daß noch weitere, bis *dato* unbekannte Epitope an der impfinduzierten zellulären Immunantwort beteiligt sein müssen.

Für das hier untersuchte Kollektiv bestand keine Korrelation zwischen der Intensität der gemessenen T-Zellproliferation und der Zeitspanne zwischen Impfung und Probennahme, d. h. auch bei Spendern mit lang zurückliegender Immunisierung konnte *in vitro* eine sehr hohe T-Zellproliferation induziert werden.

Tabelle 3-1: HBsAg-spezifische T-Zellproliferation nach HBV-Grundimmunisierung*

Spender	Antigen				
	HBsAg	P1wt	P2wt	P3wt	P4wt
1	13 ± 4	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 0	1 ± 1
2	79 ± 8	7 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	7 ± 1
3	19 ± 3	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	1 ± 1
4	13 ± 2	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
5	11 ± 1	12 ± 2	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 2
6	7 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
7	113 ± 12	1 ± 1	1 ± 1	12 ± 2	52 ± 7
8	12 ± 1	1 ± 2	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 1
9	15 ± 4	11 ± 1	1 ± 1	9 ± 1	2 ± 1
10	61 ± 6	11 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	11 ± 3
11	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
12	6 ± 2	1 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 2
13	8 ± 3	1 ± 1	2 ± 1	4 ± 1	9 ± 2
14	11 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 2
15	3 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 0
16	15 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	8 ± 1	32 ± 5
17	14 ± 3	1 ± 2	1 ± 0	1 ± 0	14 ± 2
18	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0
19	34 ± 3	17 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	44 ± 6
20	7 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
21	26 ± 2	2 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	1 ± 1
22	3 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
23	52 ± 4	9 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 0
24	6 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
25	4 ± 2	1 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
26	13 ± 2	13 ± 1	1 ± 1	1 ± 2	29 ± 3
27	7 ± 1	12 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	55 ± 5
28	12 ± 2	1 ± 1	1 ± 2	2 ± 1	2 ± 1
29	31 ± 4	10 ± 1	5 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
30	24 ± 2	14 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	19 ± 2

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit rekombinantem HBsAg (5 µg/ml HBsAg) oder synthetischen Peptiden (20 µg/ml P1wt-P4wt) stimuliert (siehe 2.2.3.1). Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI], wobei $SI \geq 3$ als positiv gelten (Fettdruck, grau unterlegt). Gezeigt sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Die unspezifische Lymphozytenproliferation wurde durch Verwendung der Kontrollantigene (BSA bzw. HIV-Peptid) ermittelt und lag in allen Versuchen bei ≤ 3 .

3.1.3 Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort

Die bislang veröffentlichten Daten bezüglich der Korrelation von humoraler Immunantwort *in vivo* und zellulärer Immunantwort *in vitro* nach Hepatitis B-Vakzinierung sind widersprüchlich. Während einige Gruppen eine deutliche Korrelation zwischen den beiden Immunparametern fanden (Min *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 2000), konnte dies in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden (Tsutsui *et al.*, 1991).

Für das in dieser Arbeit untersuchte Spenderkollektiv ($n = 30$) konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Intensität der proliferativen T-Zellantwort und den zur gleichen Zeit gemessenen, spezifischen Antikörpertitern gefunden werden (Abb. 3-2).

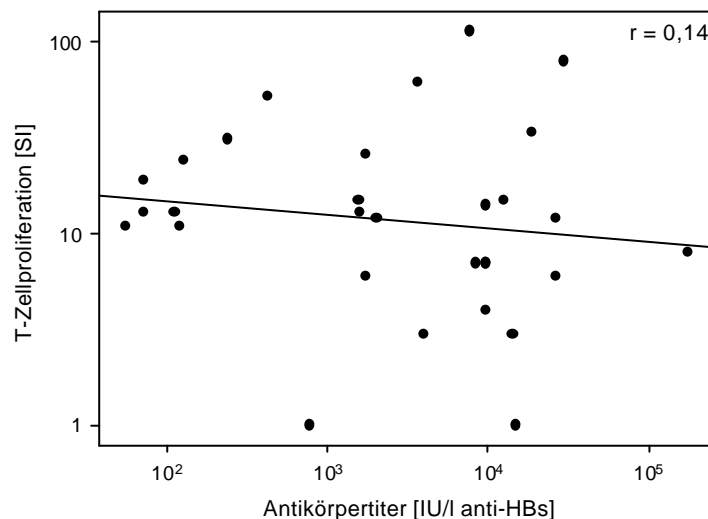


Abbildung 3-2: Korrelation von zellulärer und humoraler Immunantwort nach HBV-Grundimmunisierung.

Dargestellt ist ein Vergleich der Intensität von zellulärer (T-Zellproliferation) und humoraler (anti-HBs-Titer) Immunantwort innerhalb des untersuchten Spenderkollektivs. Für die beiden immunologischen Parameter besteht bei linearer Regression keine Korrelation ($r = 0,14$).

3.1.4 Überprüfung der MHC-Restriktion der HBsAg-Präsentation

Die experimentellen Daten zeigen, daß durch die Zugabe von Antigen (HBsAg oder synthetische Peptide) *in vivo* eine effiziente antigenspezifische Immunantwort induziert werden kann. Sowohl die exogene Antigenzugabe als auch die Länge der

synthetischen Peptide sprechen für eine Reaktion von CD4⁺-T-Lymphozyten und somit für eine Restriktion der Antigene durch MHC Klasse II-Moleküle.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde zunächst die Art der reaktiven T-Zellen (CD4⁺ oder CD8⁺) bestimmt. Durch Zellseparation wurden CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen aus der PBL-Population entfernt und die so präparierten PBL im Proliferationsassay eingesetzt.

Das Entfernen der CD4⁺-Zellpopulation führte zum völligen Verlust der T-Zellreaktivität, wohingegen das Fehlen der CD8⁺-Population keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation aufweist (Abb. 3-3).

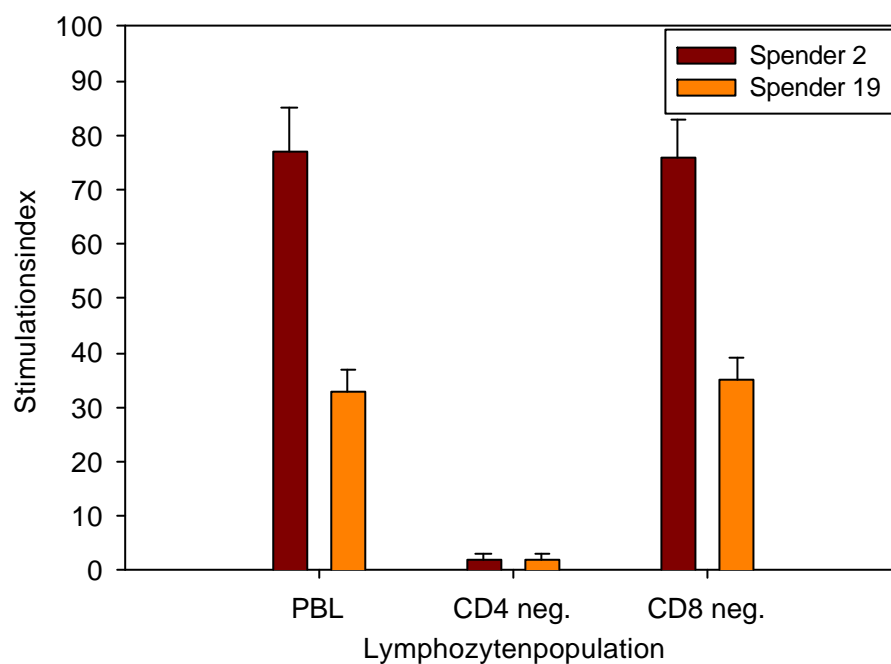


Abbildung 3-3: Charakterisierung der HBsAg-spezifischen reaktiven T-Zellen.

CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten wurden aus der Gesamt-PBL-Population entfernt (CD4 neg. und CD8 neg.; siehe 2.2.2.2) und die so erhaltenen Fraktionen im Vergleich mit der Gesamt-Lymphozytenpopulation (PBL) in Proliferationsassays getestet. Eingesetzt wurden je 1×10^5 Zellen/Ansatz unter Stimulation mit 5 µg/ml HBsAg. Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI] wobei SI ≥ 3 als positiv gelten. Gezeigt sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Die Effektivität der Depletion wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft und lag bei mehr als 95%.

Da die HBsAg-spezifische Immunantwort wie gezeigt von CD4⁺-T-Zellen vermittelt wird, muß demzufolge die Antigenpräsentation durch MHC Klasse II-Moleküle erfolgen. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die gegen MHC Klasse I- bzw MHC Klasse II-Moleküle gerichtet sind, wurde diese Restriktion in Inhibitionsversuchen nochmals bestätigt (Abb. 3-4).

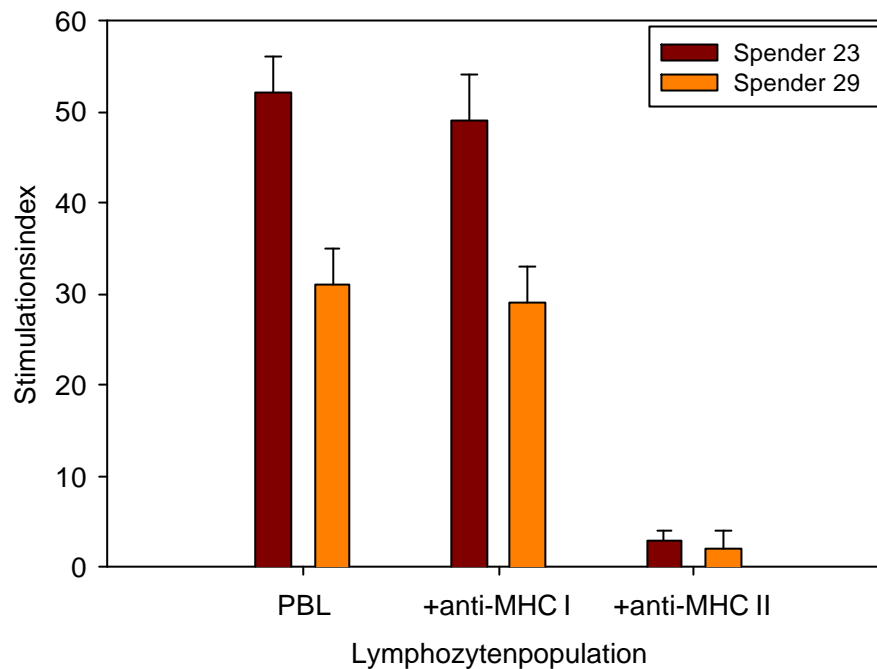


Abbildung 3-4: MHC-Restriktion der HBsAg-spezifischen T-Zellantwort

In Inhibitionsversuchen wurde die an der HBsAg-Präsentation beteiligte Klasse von MHC-Molekülen ermittelt (gezeigt sind die Daten zweier Spender, die das Gesamtergebnis wiedergeben). Getestet wurden je 1×10^5 Zellen/Ansatz unter Zugabe von 5 µg/ml HBsAg. Monoklonale Antikörper, die gegen MHC Klasse I (+ anti-MHC I) bzw. gegen MHC Klasse II (+anti-MHC II) gerichtet sind, wurden dabei dem Standardansatz in einer Endkonzentration von 1:1000 zugegeben. Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI] wobei $SI \geq 3$ als positiv gelten. Gezeigt sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde.

3.1.5 Charakterisierung HBsAg-spezifischer T-Helferzellen anhand ihrer Zytokinsekretion

Da der Proliferationsassay keine Aussage über die Klasse der reaktiven T-Zellpopulation -Th1 oder Th2- und der Häufigkeit spezifischer T-Zellen erlaubt, wurde zur Bestimmung dieser Parameter der Elispot etabliert. In diesem Test werden aktivierte T-Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion charakterisiert. Die Bestimmung zytokinsezernierender Zellen auf Einzelzellniveau ermöglicht zudem die Analyse antigenspezifischer T-Zellen, die in sehr geringen Zellzahlen vorhanden sind.

Die Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen Th1 und Th2 erfolgte anhand ihres Zytokinmusters. Während T-Helferzellen des Typs 1 (Th1) die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sezernieren, erfolgt nach antigener Stimulation von Th2-Zellen die Ausschüttung der Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zur Unterscheidung von Th1- und Th2-Zellen IFN- γ (Th1) und IL-4 (Th2) als Marker-Zytokine verwendet.

Um weitere IFN- γ -produzierende Zellen, speziell Natürliche Killerzellen (NK-Zellen, CD56⁺) als reaktive Zellpopulation auszuschließen, wurde in Vorversuchen der Einfluß der NK-Zellen auf die Gesamt-IFN- γ Produktion bestimmt. NK-Zellen wurden aus der PBL-Population entfernt und die so erhaltene Fraktion im Vergleich zu unfraktionierten PBL auf ihre IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit HBsAg getestet.

Während nach Entfernung der CD4⁺-Zellen die Zahl der gemessenen reaktiven, IFN- γ -produzierenden Zellen drastisch reduziert ist, hat dies im Fall von CD56⁺-NK-Zellen lediglich eine geringe Auswirkung auf die IFN- γ -Sekretion (Abb. 3-5). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß das Vorhandensein von NK-Zellen die Ergebnisse aus den IFN- γ -Elispots nicht verfälscht.

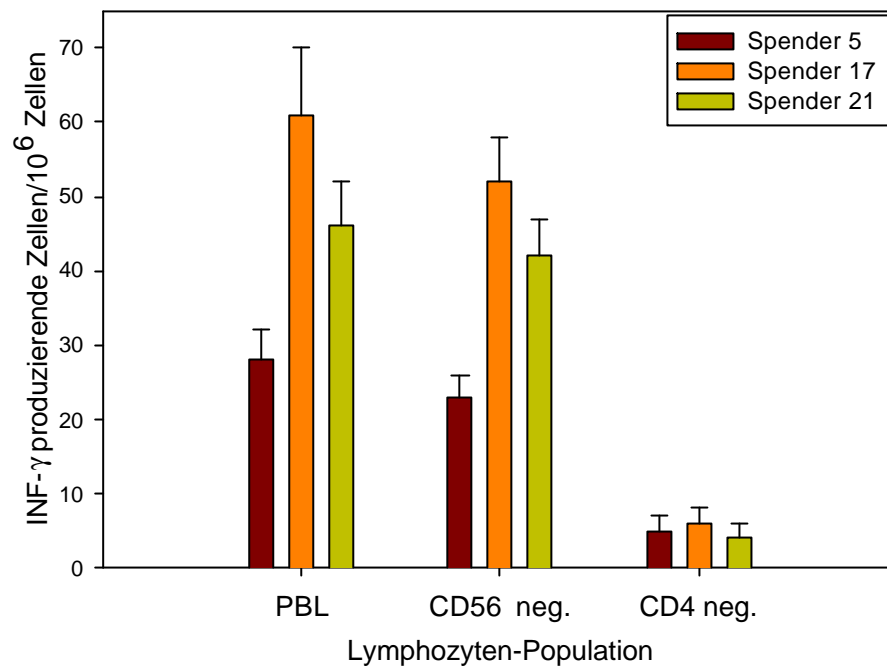


Abbildung 3-5: Einfluß von NK-Zellen auf die Gesamt IFN- γ -Produktion.

T-Zellen ($CD4^+$) und NK-Zellen ($CD56^+$) wurden aus der Gesamt-PBL-Population entfernt (siehe 2.2.2.2) und die so erhaltenen Fraktionen ($CD4$ neg. und $CD56$ neg.) im Vergleich zu der Gesamt-Lymphozytenpopulation (PBL) im IFN- γ -Elispot getestet. Gezeigt sind die Daten von drei Spendern, die das Gesamtergebnis repräsentieren. Eingesetzt wurden je 1×10^5 Zellen/Ansatz, die mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg stimuliert wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Die Effektivität der Depletion wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft und lag bei mehr als 95%.

3.1.5.1 Stimulation mit Gesamt-HBsAg

Die im Elispot erzielten Ergebnisse (Tab. 3-2) bestätigen die Daten der Proliferationsassays (Tab. 3-1). Für Spender, die eine signifikante T-Zellproliferation auf eines der getesteten Antigene zeigten, konnten auch im Elispot reaktive HBsAg-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der reaktiven T-Zell-Subpopulation zeigten diese Versuche, daß es sich bei der T-Zellantwort um eine Th1-vermittelte Reaktion handelt. Bei keinem der getesteten Spender wurden IL-4-sezernierende Th2-Lymphozyten nachgewiesen. Die Stimulation mit HBsAg induzierte bei PBL von 28 der 30 untersuchten Spender eine Sekretion von IFN- γ , dem charakteristischen Th1-Zytokin. Bestätigt wurde diese Th1-

Dominanz durch zusätzliche Versuche, in denen die Sekretion weiterer Th2-Zytokine (IL-5 und IL-10) untersucht wurde. Demnach induziert die Stimulation mit rekombinantem HBsAg weder die Ausschüttung von IL-5 noch die von IL-10.

Die Quantifizierung der zytokinsezernierenden T-Lymphozyten im Elispot ergab eine überraschend hohe Zahl HBsAg-spezifischer T-Helfer-Zellen im peripheren Blut von geimpften Spendern. Demnach lag die Frequenz spezifischer T-Lymphozyten zwischen 1/70000 (Spender 25) und 1/16000 (Spender 17) mit einem Mittelwert von 1/29000. Bislang wurde von weitaus geringeren Zahlen (etwa 1/60000) spezifischer T-Helfer-Zellen ausgegangen (Honorati *et al.*, 1997).

Tabelle 3-2: Zahl IFN-g- und IL-4-sezernierender T-Helferzellen nach Stimulation mit HBsAg*

Antigen	HBsAg		BSA		Antigen	HBsAg		BSA	
Zytokin	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4	Zytokin	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4
Spender					Spender				
1	19 ± 3	4 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	16	42 ± 5	1 ± 1	3 ± 1	2 ± 2
2	53 ± 3	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 1	17	61 ± 9	0 ± 0	2 ± 0	2 ± 2
3	28 ± 4	5 ± 2	5 ± 2	3 ± 2	18	8 ± 3	5 ± 3	3 ± 1	2 ± 2
4	23 ± 3	2 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	19	57 ± 7	2 ± 1	2 ± 2	4 ± 2
5	28 ± 4	7 ± 2	2 ± 2	4 ± 2	20	24 ± 4	4 ± 2	3 ± 2	2 ± 2
6	22 ± 2	3 ± 2	4 ± 1	2 ± 1	21	46 ± 6	0 ± 0	2 ± 1	0 ± 0
7	52 ± 7	8 ± 2	5 ± 2	2 ± 2	22	16 ± 3	1 ± 1	3 ± 1	2 ± 1
8	24 ± 3	3 ± 1	3 ± 1	2 ± 2	23	53 ± 8	3 ± 2	3 ± 2	1 ± 1
9	43 ± 5	5 ± 2	3 ± 1	2 ± 1	24	24 ± 4	0 ± 0	4 ± 3	1 ± 1
10	41 ± 6	3 ± 2	3 ± 2	1 ± 2	25	14 ± 2	1 ± 2	2 ± 2	0 ± 0
11	9 ± 3	6 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	26	42 ± 6	4 ± 2	4 ± 3	3 ± 1
12	19 ± 3	7 ± 2	2 ± 1	3 ± 2	27	41 ± 3	3 ± 2	2 ± 1	2 ± 2
13	48 ± 5	5 ± 2	3 ± 1	2 ± 1	28	23 ± 2	1 ± 0	4 ± 2	0 ± 0
14	27 ± 5	8 ± 3	2 ± 0	3 ± 2	29	38 ± 5	2 ± 1	3 ± 2	2 ± 1
15	15 ± 3	6 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	30	46 ± 7	5 ± 2	3 ± 2	2 ± 0

*PBL wurden mit rekombinantem HBsAg stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt in Zytokin-Elispotassays ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer Zellen pro 1×10^6 PBL wieder (signifikante Werte: Fettdruck, grau unterlegt). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Als unspezifisches Kontrollantigen wurde BSA verwendet.

3.1.5.2 Stimulation mit HBsAg-Peptiden

Im Fall der vier getesteten Peptide (Tab. 3-3) wurden Frequenzen zwischen 1/22000 (Spender 27) und 1/38000 (Spender 5) für P1wt, 1/29000 (Spender 21) und 1/52000 (Spender 29) für P2wt, 1/30000 (Spender 9) und 1/45000 (Spender 21) für P3wt, sowie 1/18000 (Spender 7) und 1/30000 (Spender 30) für P4wt ermittelt. Insgesamt wurden mit Peptid P4wt die höchsten Frequenzen spezifischer T-Zellen gemessen, was die immunodominante Rolle des entsprechenden Epitops nochmals bestätigt. Analog zu den Versuchen mit Gesamt-HBsAg wurde auch durch die Stimulation mit Peptiden lediglich die Sekretion von IFN- γ induziert.

Tabelle 3-3: Frequenzanalyse Peptid-spezifischer T-Helferzellen*

Antigen	P1wt		P2wt		P3wt		P4wt		HIV	
Zytokin	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4	IFN γ	IL4
Spender										
1	3 \pm 2	5 \pm 2	4 \pm 2	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	0 \pm 0	7 \pm 3	2 \pm 1	4 \pm 3
2	32 \pm 2	7 \pm 2	2 \pm 2	2 \pm 1	0 \pm 0	5 \pm 2	38 \pm 3	8 \pm 2	3 \pm 2	5 \pm 2
3	5 \pm 1	3 \pm 2	0 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 2	6 \pm 3	4 \pm 2	6 \pm 2	4 \pm 2	3 \pm 2
4	3 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	3 \pm 1	5 \pm 2	4 \pm 1	0 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1	4 \pm 2
5	26 \pm 3	4 \pm 2	0 \pm 0	5 \pm 2	0 \pm 0	2 \pm 1	6 \pm 3	3 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 2
6	4 \pm 1	1 \pm 1	4 \pm 2	7 \pm 3	1 \pm 1	3 \pm 1	1 \pm 2	6 \pm 2	2 \pm 2	5 \pm 3
7	5 \pm 2	3 \pm 2	1 \pm 0	4 \pm 1	25 \pm 3	5 \pm 2	57 \pm 4	7 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
8	3 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 3	6 \pm 2	2 \pm 2	5 \pm 2	1 \pm 2	6 \pm 2
9	32 \pm 3	5 \pm 1	1 \pm 1	3 \pm 2	33 \pm 4	7 \pm 2	0 \pm 0	1 \pm 1	3 \pm 2	4 \pm 2
10	30 \pm 2	4 \pm 2	0 \pm 0	4 \pm 2	4 \pm 2	6 \pm 2	39 \pm 3	5 \pm 2	2 \pm 3	3 \pm 2
11	7 \pm 3	2 \pm 2	2 \pm 2	2 \pm 1	0 \pm 0	3 \pm 2	4 \pm 3	2 \pm 2	2 \pm 1	2 \pm 0
12	2 \pm 1	1 \pm 1	4 \pm 2	6 \pm 2	7 \pm 4	4 \pm 1	1 \pm 1	3 \pm 2	4 \pm 1	4 \pm 2
13	1 \pm 1	3 \pm 2	3 \pm 1	4 \pm 2	28 \pm 2	2 \pm 1	49 \pm 3	6 \pm 2	1 \pm 1	3 \pm 2
14	0 \pm 0	2 \pm 2	0 \pm 0	2 \pm 1	1 \pm 1	8 \pm 3	5 \pm 2	4 \pm 2	4 \pm 2	1 \pm 1
15	2 \pm 1	3 \pm 2	5 \pm 2	1 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 1	7 \pm 3	1 \pm 1	3 \pm 2
16	3 \pm 1	4 \pm 2	1 \pm 1	3 \pm 1	24 \pm 4	5 \pm 1	51 \pm 3	8 \pm 4	2 \pm 2	4 \pm 3
17	4 \pm 2	6 \pm 2	0 \pm 0	0 \pm 0	4 \pm 2	6 \pm 2	51 \pm 5	9 \pm 4	4 \pm 2	2 \pm 0
18	2 \pm 2	4 \pm 2	1 \pm 1	3 \pm 2	1 \pm 1	4 \pm 2	7 \pm 4	0 \pm 0	4 \pm 2	4 \pm 2
19	26 \pm 3	7 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 2	0 \pm 0	6 \pm 2	57 \pm 2	5 \pm 2	1 \pm 1	1 \pm 0
20	0 \pm 0	5 \pm 2	5 \pm 2	0 \pm 0	6 \pm 3	4 \pm 2	5 \pm 3	2 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 1
21	2 \pm 1	4 \pm 2	34 \pm 5	5 \pm 2	22 \pm 4	1 \pm 1	3 \pm 2	0 \pm 0	2 \pm 2	4 \pm 1
22	5 \pm 2	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 2	7 \pm 3	0 \pm 0	7 \pm 2	1 \pm 2	3 \pm 2
23	26 \pm 3	5 \pm 2	0 \pm 0	1 \pm 1	4 \pm 2	4 \pm 2	0 \pm 0	4 \pm 2	1 \pm 0	1 \pm 2
24	3 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	6 \pm 4	0 \pm 0	2 \pm 2	3 \pm 0
25	7 \pm 5	6 \pm 2	5 \pm 2	3 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1	2 \pm 1	5 \pm 3	3 \pm 2	2 \pm 1
26	30 \pm 3	7 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	5 \pm 2	0 \pm 0	49 \pm 4	7 \pm 3	2 \pm 1	2 \pm 0
27	45 \pm 4	6 \pm 2	4 \pm 2	0 \pm 0	1 \pm 1	8 \pm 3	39 \pm 1	8 \pm 3	2 \pm 0	4 \pm 3
28	2 \pm 2	4 \pm 2	2 \pm 1	4 \pm 2	0 \pm 0	1 \pm 1	2 \pm 2	4 \pm 2	3 \pm 1	2 \pm 1
29	34 \pm 3	7 \pm 1	19 \pm 3	6 \pm 2	2 \pm 2	2 \pm 2	3 \pm 2	5 \pm 2	1 \pm 0	2 \pm 0
30	37 \pm 4	5 \pm 2	0 \pm 0	7 \pm 3	7 \pm 5	4 \pm 2	33 \pm 2	8 \pm 3	4 \pm 2	3 \pm 1

*PBL wurden mit synthetischen Peptiden P1wt - P4wt stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im Zytokin-Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ - bzw. IL-4-sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder (signifikante Werte: Fettdruck, grau unterlegt). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Als unspezifisches Kontrollpeptid wurde ein HIV-Peptid verwendet.

3.1.6 Identifizierung weiterer CD4⁺-T-Zell-Epitope

Die Ergebnisse aus Proliferationsassays und Elispot warfen die Frage auf, ob Spender, die trotz signifikanter Reaktion auf das Gesamt-HBsAg keine Reaktivität auf eines der vier untersuchten Epitope zeigten (n = 13), auf andere, bislang unbekannte Epitope reagieren. Mit Hilfe überlappender Peptide, die die gesamte Sequenz des HBsAg abdeckten, sollte diese Möglichkeit untersucht werden (siehe Tab. 2-3). Die Peptide mit einer Länge von 20 Aminosäuren und einer Überlappungsregion von 10 Aminosäuren sollten in den beiden Testsystemen Proliferationsassay und Elispot auf ihre stimulatorische Kapazität untersucht werden.

Neben den bereits bekannten Epitopen P1wt - P4wt, die durch die Peptide S1 und S2 (P1wt), S14 und S15 (P2wt), S16 und S17 (P3wt) sowie S21 (P4wt) repräsentiert wurden, konnten jedoch keine weiteren Sequenzbereiche mit vergleichbarer stimulatorischer Kapazität innerhalb des untersuchten Gesamtkollektivs identifiziert werden.

Für die Peptide S10 und S11, sowie S18 und S19 wurden unter Verwendung von PBL der Spender 25 und 22 (S10/S11) und Spender 11 und 19 (S12/13) in Proliferationsassays Stimulationsindices erreicht, die im Grenzwertbereich von SI = 3 lagen, im Elispot konnte jedoch verglichen mit dem Kontroll-Peptid keine signifikant höhere Zahl Zytokinsezernierender T-Zellen gemessen werden. Auch eine Erhöhung der Peptidkonzentration führte zu keiner eindeutig positiven Reaktion.

3.1.7 CTL-Epitope

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das mögliche Auftreten von HBsAg-spezifischen CTL nach Hepatitis B-Impfung untersucht werden.

Getestet wurden acht, in der Literatur beschriebene, HLA-A2-restringierte CTL-Epitope (CTL1-8, siehe Tab. 2-6), wobei nach dem generellen Elispot-Testprinzip verfahren wurde. Reaktive CD8⁺-T-Zellen, HLA-A2-positiver Spender sollten dabei

anhand ihrer INF- γ -Produktion identifiziert werden. Bedingt durch die Länge der verwendeten Peptide (9 Aminosäuren) konnte weitgehend ausgeschlossen werden, daß in diesem Test eine vorhandene CD4⁺-T-Zellantwort (MHC Klasse II-restringierte Epitope haben in der Regel eine Länge von >12 Aminosäuren) die Resultate verfälschen könnte.

Zusammenfassend konnte selbst mit der sensitiven Methode des Elispot keine CTL-Aktivität CD8⁺-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Zahl INF- γ -produzierender Zellen nach Stimulation mit den CTL-Peptiden 1-8 lag nur unwesentlich höher als die mit unspezifischem Antigen (HIV-Peptid) ermittelten Werte.

3.1.8 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung der durch die Hepatitis B-Impfung induzierten zellulären Immunantwort wurde die Reaktivität spezifischer T-Zellen auf Stimulation mit dem gesamten HBsAg und davon abgeleiteten Peptiden untersucht.

Die zelluläre Immunantwort *in vitro* wurde mittels Lymphozytenproliferation-Tests und *enzyme-linked immunospot-assays* (Elispot) gemessen; letzterer erfaßt die Fähigkeit einzelner T-Lymphozyten als Reaktion auf antigene Stimulation hin Zytokine zu sezernieren. Durch die Etablierung des Elispots zur Frequenzanalyse zytokinsezernierender Zellen lag ein äußerst sensibles Testsystem. Der Nachweis reaktiver T-Zellen anhand ihrer spezifischen Zytokinsekretion ermöglichte zugleich die Charakterisierung der HBsAg-spezifischen T-Zellsubpopulation.

Vergleichende immunologische Untersuchungen unter Verwendung des Hepatitis B-Oberflächenantigens (HBsAg) ergaben bei 93 % der getesteten Spender des untersuchten Kollektivs (n = 30) eine positive Reaktion auf das rekombinante Antigen. Eine signifikante Reaktion auf eines der untersuchten MHC Klasse II-restringierten T-Helferzell-Epitope wurde bei 50 % der Probanden festgestellt. Die Epitope P1wt und

P4wt waren hierbei immunodominant gegenüber P2wt und P3wt. Die T-Helferzell-Antwort wird dabei ausschließlich von Th1-Lymphozyten vermittelt. Die Austestung von überlappenden, das Gesamt-HBsAg abdeckenden, Peptiden lieferte keine Hinweise auf zusätzliche T-Helferzell-Epitope.

Eine MHC Klasse I-restringierte Immunantwort von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen konnte für keinen der Spender nachgewiesen werden.

3.2 Einfluß von IFN- γ und TNF- α auf die Virusreplikation in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten

Die vorherigen Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß die zelluläre Immunantwort nach einer Hepatitis B-Impfung durch CD4⁺-T-Lymphozyten der Th1-Subpopulation vermittelt wird. Ein charakteristisches Merkmal dieser T-Zell-Population ist die Sekretion der Zytokine IFN- γ und TNF- α . Aus verschiedenen anderen Arbeiten ist bekannt, daß diese Zytokine den Verlauf einer Hepatitis B-Infektion entscheidend beeinflussen können (Chisari, 1997; Schultz *et al.*, 1999).

Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Versuchen an einem *in vitro*-Infektionsmodell primärer humaner Hepatozyten, die Wirkung der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α charakterisiert.

3.2.1 *In vitro*-Infektionsmodell für primäre humane Hepatozyten

Ein durch Herrn Ulrich Tausch in unserer Arbeitsgruppe etabliertes *in vitro*-Infektionsmodell ermöglicht es, primäre humane Hepatozyten (PHH) mit HBV zu infizieren und über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen bei hoher Vitalität (> 80 %) zu kultivieren. PHH wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ auf einer extrazellulären Matrix aus Rattenschwanzkollagen in einem durch Hormone und Wachstumsfaktoren supplementierten Medium kultiviert und je nach

Differenzierungszustand 2-3 Tage nach Isolierung mit HBV aus Serum eines chronischen Virus-Trägers infiziert.

Der Infektionsverlauf wurde anhand der Parameter HBeAg, HBsAg und HBV-DNA bestimmt. Um eine Nettoproduktion zeigen zu können, mußte sichergestellt werden, daß die im Inokulum enthaltenen viralen Antigene sowie die virale Nukleinsäure nach erfolgter Infektion durch effektive Waschschrte ausverdünnt werden.

Die Kinetik dieser Ausverdünnung wurde durch Kontrollversuche belegt, wobei PHH-Kulturen durch Behandlung mit 70 %igem Ethanol abgetötet, einer Standardinfektion unterzogen und die Ausverdünnung des Inokulum durch tägliche Verlaufskontrolle nachgewiesen wurde.

Abbildung 3-6 zeigt den typischen Verlauf einer *in vitro*-Infektion von PHH.

HBeAg tritt dabei als frühes Antigen bereits 3-4 Tage nach erfolgter Infektion auf, wohingegen die Neuproduktion von HBsAg erst etwa 6-7 Tage nach Infektion nachgewiesen werden kann. Die Neusynthese viraler DNA folgt einer der HBsAg-Produktion ähnlichen Kinetik und bietet durch ein quantitatives Nachweissystem einen sensitiven Parameter um eine produktive Infektion zeigen zu können. Der gleichzeitige Nachweis von HBeAg, HBsAg und HBV-DNA erlaubt demnach zuverlässige Aussagen über die Effektivität und insbesondere über die Kinetik einer *in vitro*-HBV-Infektion.

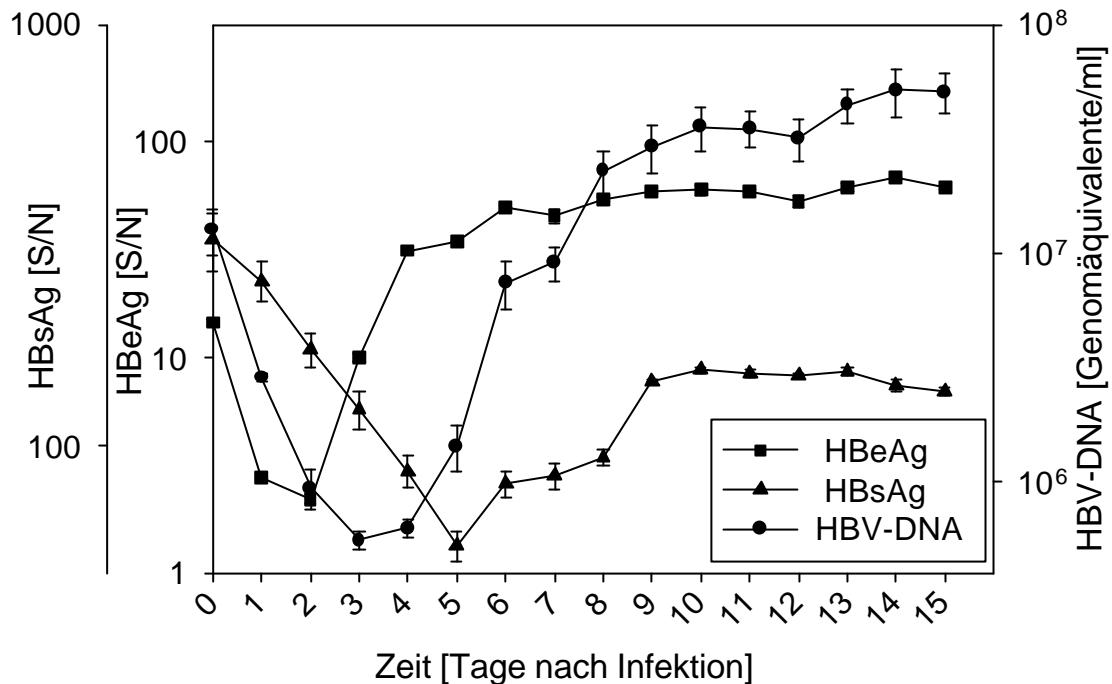


Abbildung 3-6: Kinetik einer *in vitro*-Infektion primärer humaner Hepatozyten.

PHH in einer Dichte von $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ wurden 3 Tage nach Isolierung mit HBV aus Serum eines chronischen Virus-Trägers infiziert, wobei das Inokulum für einen Zeitraum von 16 h auf den Zellen verblieb. Nach mehreren Waschschritten erfolgte unter täglichem Mediumwechsel die Weiterkultivierung. Aus den entnommenen Überständen wurde die Kinetik der Infektion durch Messung von HBsAg (quantitativ), HBeAg (semi-quantitativ) und HBV-DNA (quantitativ) bestimmt. Die gezeigten Meßwerte geben den Mittelwert aus 2 Parallelansätzen wieder. In Kontrollansätzen wurde die Ausverdünnung des passiv zugegebenen HBsAg bestimmt; die Konzentration lag dabei 4 Tage nach erfolgter Infektion unter der Nachweisgrenze.

3.2.2 Wirkung von Th1-Zytokinen auf die *in vitro*-Infektion von PHH

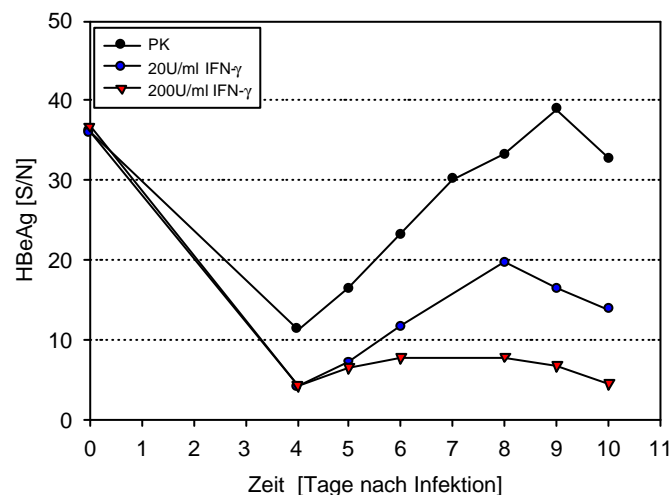
In nachfolgenden Versuchen soll die Wirkung der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α auf die Infektion primärer humaner Hepatozyten untersucht werden. Hierfür erfolgte im Zuge einer Standardinfektion die Zugabe von IFN- γ und TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten. IFN- γ wurde in Konzentrationen von 20 und 200 U/ml Kulturmedium, TNF- α in Konzentrationen von 100 und 1000 U/ml Kulturmedium zugegeben. Diese Zugabe erfolgte entweder gleichzeitig mit Zugabe des Inokulums, oder beginnend an Tag 2 und an Tag 7 nach Infektion. Allen Ansätzen gemeinsam war ein täglicher kompletter Mediumwechsel,

wobei die Zytokine jeweils neu zugegeben wurden. Die Kinetik der Infektion wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen anhand der zwei Parameter HBeAg und HBV-DNA bewertet. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sowohl IFN- γ als auch TNF- α die Effektivität einer Infektion entscheidend beeinflussen können (Abb. 3-7 und 3-8).

3.2.2.1 Einfluß von IFN- γ auf die HBeAg-Neuproduktion

Die Zugabe von IFN- γ führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der HBeAg-Produktion, wobei bereits mit der niedrigsten Dosis von 20 U/ml eine Reduktion um etwa 40 % zu beobachten ist (Abb. 3-7). Bei Verwendung der hohen Konzentrationen von IFN- γ sinkt die HBeAg-Konzentration auf Werte im Bereich der Nachweisgrenze. Dieser Effekt ist jedoch sehr stark vom Zeitpunkt der Zugabe abhängig. Lediglich eine sehr frühe Verwendung von IFN- γ beginnend am Tag der Infektion, induziert diesen signifikanten Effekt. Erfolgt die Zugabe 48 h nach Infektion, ist eine 40 %ige Reduktion nur mit den hohen Dosen von 200 U/ml zu beobachten.

Die im Verlauf der Infektion sehr späte Zugabe von IFN- γ an Tag 7 führt scheinbar in der hohen Konzentrationen zu einem kurzfristigen Effekt, meßbar an einem signifikanten Abfall der HBeAg-Konzentration 24 h nach der ersten Zugabe. Diese Wirkung hält jedoch in diesem Fall nicht an, so daß im weiteren Infektionsverlauf ein Anstieg der HBeAg-Sekretion zu beobachten ist.



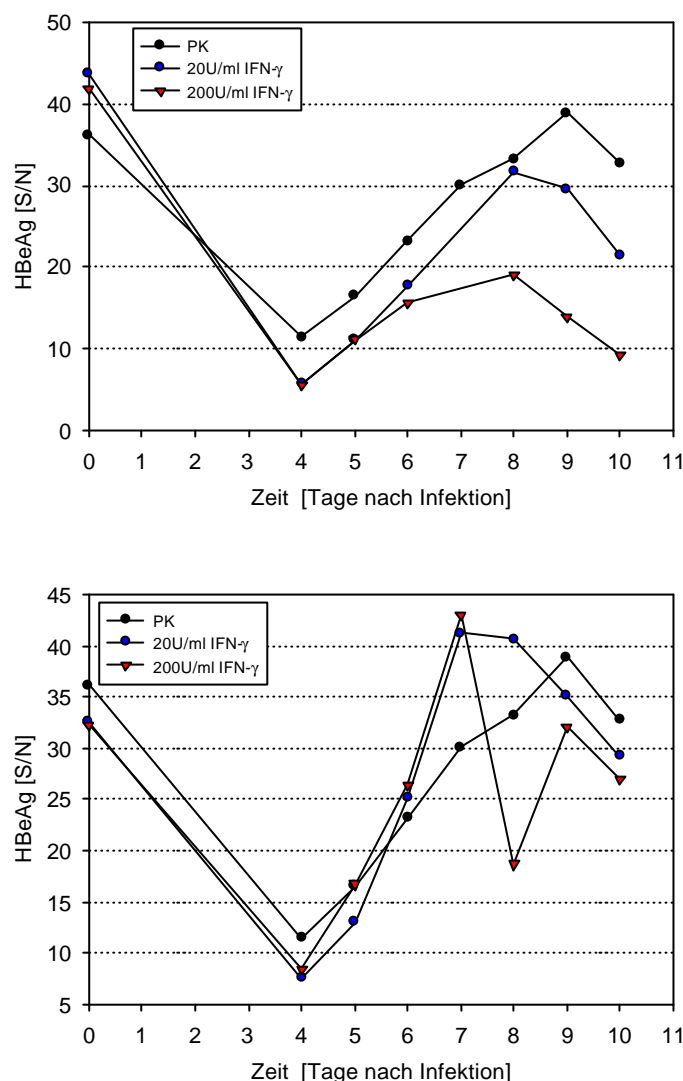


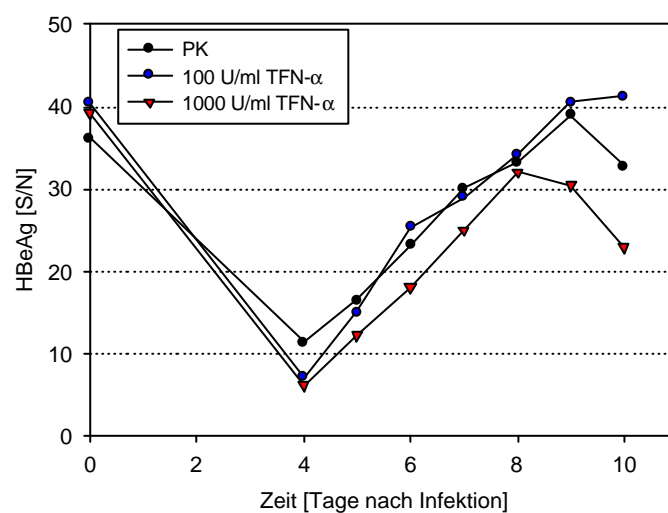
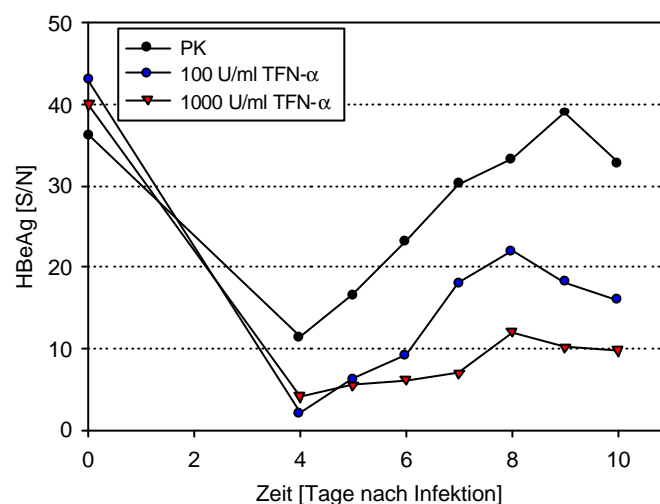
Abbildung 3-7: Infektion von PHH unter Zugabe von IFN- γ : Kinetik der HBeAg-Produktion.

PHH in einer Dichte von $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ wurden 3 Tage nach Isolierung mit HBV-Serum eines chronischen Virus-Trägers infiziert. Neben dem Standardansatz (Infektion ohne Zytokinzugaben; PK) wurde dem Kulturmedium in drei weiteren Ansätzen zu den Zeitpunkten t_0 (A), t_2 (B) und t_7 (C) nach Infektion verschiedene Konzentrationen an IFN- γ (20 bzw. 200U/ml) zugesetzt. Gezeigt ist die Kinetik der HBeAg-Produktion, wobei die Meßwerte den Mittelwert aus 2 Parallelansätzen wiedergeben. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Mikropartikel-Enzymimmunoassay.

3.2.2.2 Einfluß von TNF- α auf die HBeAg-Neuproduktion

Die Zugabe von TNF- α führt ebenfalls zu einer Reduktion der HBeAg-Neusynthese, wobei dieser Effekt, analog der Wirkung von IFN- γ , abhängig vom Zeitpunkt der

Zugabe ist (Abb. 3-8). TNF- α hat jedoch im Gegensatz zu IFN- γ lediglich bei Zugabe ab dem Tag der Infektion (t_0) signifikante Auswirkungen auf die HBeAg-Produktion. Erfolgt die Zugabe beginnend ab Tag 2 nach Infektion bzw. ab Tag 7, ist die HBeAg-Synthese davon nahezu unbeeinflusst.



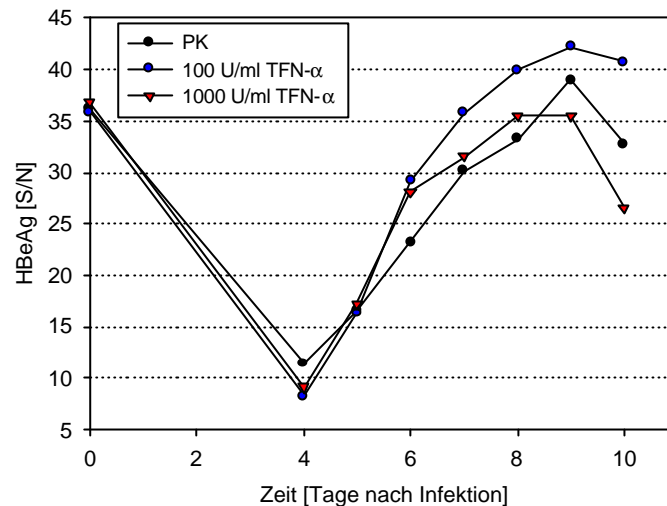


Abbildung 3-8: Infektion von PHH unter Zugabe von TNF- α : Kinetik der HBeAg-Produktion.

PHH in einer Dichte von $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ wurden 3 Tage nach Isolierung mit HBV aus Serum eines chronischen Virus-Trägers infiziert. Neben dem Standardansatz (Infektion ohne Zytokinzugaben; PK) wurde dem Kulturmedium in drei weiteren Ansätzen zu den Zeitpunkten t_0 (A), t_2 (B) und t_7 (C) nach Infektion verschiedene Konzentrationen an TNF- α (100 bzw. 1000 U/ml) zugesetzt. Gezeigt ist die Kinetik der HBeAg-Produktion, wobei die Meßwerte den Mittelwert aus 2 Parallelansätzen wiedergeben. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Mikropartikel-Enzymimmunoassay.

3.2.2.3 Quantifizierung viraler DNA

Durch den quantitativen Nachweis viraler DNA kann in dem beschriebenen Infektionsmodell der Einfluß von IFN- γ und TNF- α auf die Virusreplikation bestimmt werden.

In Vorversuchen zeigte sich, daß die Konzentration an HBV-DNA am Tag 5 nach Infektion ein Minimum erreicht. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Neuproduktion von DNA in den infizierten Hepatozyten und erreicht am Tag 8 ihren Höhepunkt. Auch in diesen Versuchen konnte ein derartiger Verlauf beobachtet werden. Abbildung 3-9 zeigt daher nur die drei entscheidenden Zeitpunkte Tag 0, 5 und 8 des gesamten Infektionsverlaufs am Beispiel der höheren der getesteten Zytokinkonzentrationen (200 U/ml IFN- γ ; 1000 U/ml TNF- α) und zu den Zeitpunkten t_1 (Zytokinzugabe ab dem Tag der Infektion, Abb. 3-9 A) und t_2 (Zytokinzugabe ab Tag 2 nach Infektion; Abb. 3-9 B)

Für die unbehandelten (ohne Zytokineinwirkung) PHH kann eine erfolgreiche Infektion anhand der Neuproduktion viraler DNA eindeutig gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu führt die Zugabe der Zytokine IFN- γ und TNF- α zu einer deutlich reduzierten Synthese viraler Nukleinsäure. Analog zu den zuvor beschriebenen Versuchen kann dieser Effekt nur durch sehr frühe Zytokineinwirkung (t_0) erzielt werden.

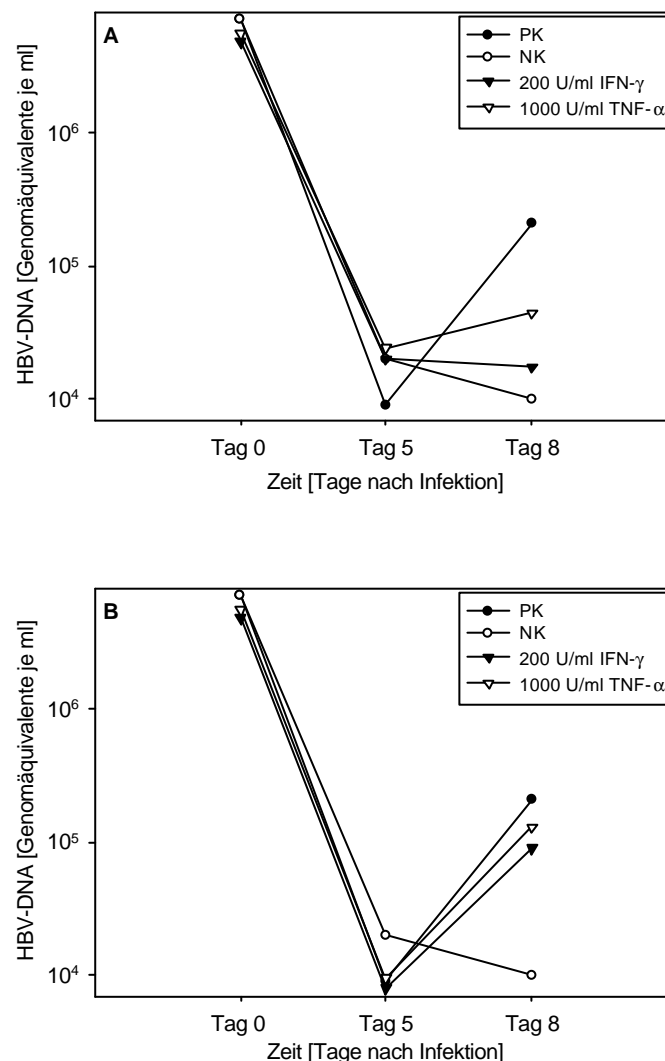


Abbildung 3-9: Quantitativer HBV-DNA-Nachweis.

PHH in einer Dichte von $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$ wurden 3 Tage nach Isolierung mit HBV aus Serum eines chronischen Virus-Trägers infiziert. Neben dem Standardansatz (Infektion ohne Zytokinzugaben; PK) erfolgte in zwei weiteren Ansätzen zu den Zeitpunkten t_0 (ab dem Tag der Infektion; A) und t_2 (ab Tag 2 nach Infektion; B) die Zugabe von IFN- γ (200 U/ml) bzw. TNF- α (1000 U/ml). Aus je 200 μl der durch Zentrifugation geklärten, zellfreien Überstände wurde virale DNA isoliert und mittels *TaqMan*-PCR quantifiziert (siehe 2.2.4.1). NK: Negativkontrolle; PHH vor Infektion mit 70 % Ethanol (30 min bei 37 °C) inkubiert.

3.2.3 Zusammenfassung

Das Modellsystem der *in vitro*-Infektion von primären humanen Hepatozyten mit HBV bietet die Möglichkeit die Wirkung der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α - auf den Verlauf einer HBV-Infektion zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe dieser Zytokine eine dosisabhängige Reduzierung der Synthese viraler Antigene (gezeigt am Beispiel des HBeAg) und viraler DNA erfolgt. Dieser Effekt wurde jedoch nur im Fall einer sehr frühen Zytokinzugabe, beginnend am Tag der Infektion, beobachtet.

3.3 Einfluß von Aminosäureaustauschen in T-Helferzell-Epitopen des HBsAg auf ihre stimulatorische Kapazität

Die in der Einleitung behandelte hohe genetische Variabilität des Hepatitis B-Oberflächenantigens legt die Frage nahe, ob auch im Bereich der T-Zell-Epitope Mutationen auftreten und wenn ja, ob demzufolge deren Erkennung durch impfinduzierte T-Helferzellen beeinflusst wird.

Um dies zu untersuchen wurde zunächst die Häufigkeit und Natur von Mutationen innerhalb der beschriebenen T-Zell-Epitope analysiert. Natürlich auftretenden Epitop-Varianten wurden dann in Form von synthetischen Peptiden auf ihre Wirkung auf T-Helferzellen in Proliferationsassays und Elispot getestet.

3.3.1 Variabilität von T-Helferzell-Epitopen des HBsAg

Die Variabilität des HBsAg erstreckt sich wie erwartet auch auf die bekannten T-Helferzell-Epitope. Untersucht wurden Varianten der beiden Epitope P1wt und P4wt. Diese Epitope induzierten bei jeweils 10 der 30 Spender unseres Kollektivs eine signifikante T-Zellantwort. Die Epitope P2wt und P3wt wurden in diese Untersuchungen nicht einbezogen, da mit 2 bzw. 5 reaktiven Spender nur ein vergleichsweise kleines Kollektiv vorhanden war.

Alle bislang in Datenbanken verfügbaren HBsAg-Sequenzdaten (n = 150) wurden bezüglich Aminosäureaustauschen in den beiden T-Zell-Epitopen untersucht (Tab. 3-4 und 3-6; Stand Januar 1999). Zusätzlich konnte auf innerhalb der Arbeitsgruppe vorhandene Sequenzen von Patientenisolaten zurückgegriffen werden. Diese Daten sind mittlerweile in der beim *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, USA) unterhaltenen GenBank-Datenbanken eingetragen (*accession numbers* AF061523-AF061528; AF065110-AF065119; AF208866-AF208877; AF209390-AF209405).

3.3.2 Natürlich auftretende Varianten der Epitope P1wt und P4wt

Für das Epitop P1wt (AS 16-33 innerhalb des HBsAg) wurden insgesamt 12 Varianten identifiziert (Tab. 3-4). Für das Epitop P4wt (AS 213-226 innerhalb des HBsAg) wurden im untersuchten Sequenzdatenmaterial 11 Varianten gefunden (Tab. 3-5). Die stimulatorische Kapazität dieser Epitop-Varianten wurde in vergleichenden immunologische Untersuchungen charakterisiert.

Tabelle 3-4: Natürlich vorkommende Varianten des Epitops P1wt

Bezeichnung	Aminosäuresequenz ^a	Häufigkeit ^b
P1 wt	QAGFFLLTRILTIPQSLD	
P1/M1	----- K -----	27
P1/M2	----- L ---	1
P1/M3	----- K ----- L ---	1
P1/M4	-- VC ----- K -----	9
P1/M5	-- VC ----- K -- K -----	1
P1/M6	-- VC ----- K - R -----	1
P1/M7	----- W -----	7
P1/M8	-- V -----	1
P1/M9	----- H	1
P1/M10	----- K ----- K ---	2
P1/M11	----- S -- K -----	1
P1/M12	----- S -- K ----- L ---	1

^a rot markiert: Aminosäureaustausch im Vergleich zur Peptid-Sequenz im HBsAg des Impfstoffs; ^b bezogen auf die untersuchten HBsAg-Varianten (n = 150)

Tabelle 3-5: Natürlich vorkommende Varianten des Epitops P4wt

Bezeichnung	Aminosäuresequenz ^a	Häufigkeit ^b
P4 wt	LPLLPIFFCLWVYI	
P4/M1	-----Y-----	1
P4/M2	F-----	1
P4/M3	I-----	11
P4/M4	I---L-----	1
P4/M5	I-----C---S-	11
P4/M6	-----C---A--	1
P4/M7	T-----	1
P4/M8	I-----I-	1
P4/M9	-----A--	5
P4/M10	-----S-	1
P4/M11	I-----A--	1

^a rot markiert: Aminosäureaustausch im Vergleich zur Peptid-Sequenz im HBsAg des Impfstoffs; ^b bezogen auf die untersuchten HBsAg-Varianten (n = 150)

3.3.3 Einfluß der Epitopvarianten auf die Proliferation HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten

3.3.3.1 Varianten des Epitops P1wt

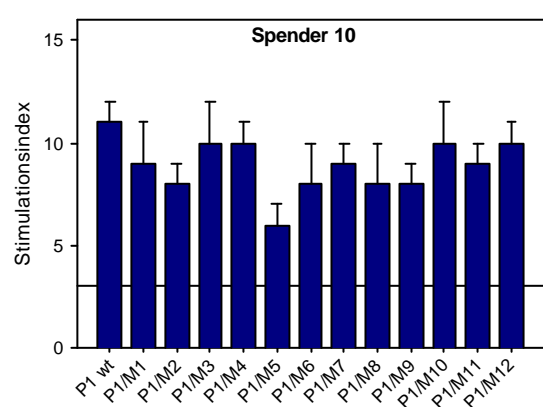
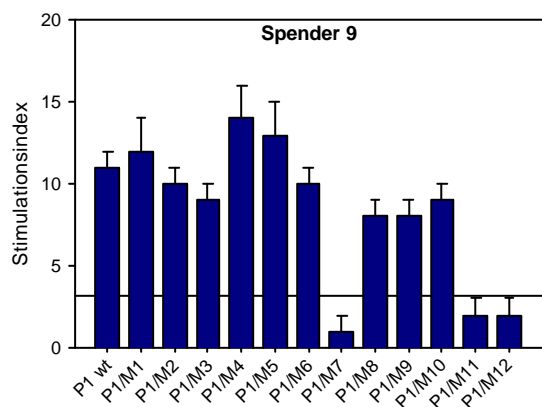
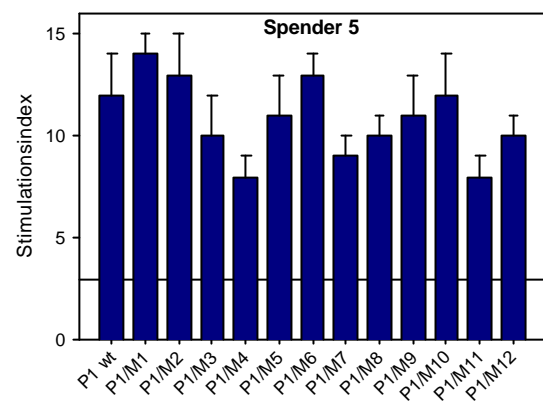
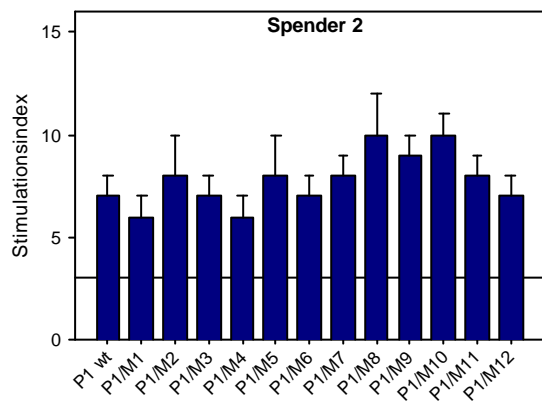
Wie unter 3.1.2 gezeigt reagierten PBL von 10 der 30 Spender auf das Wildtyp-Peptid P1wt mit einer signifikanten Proliferation. PBL dieser Spender wurden nun im Standard-Proliferationsassay (1×10^5 Zellen/Ansatz, 20 µg/ml Peptid) eingesetzt und die Induktion der T-Zell-Proliferation durch die unterschiedlichen Epitopvarianten gemessen.

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten unsere Vermutung, daß Aminosäuresubstitutionen innerhalb der T-Helferzell-Epitope deren stimulatorische Kapazität entscheidend verändern können (Abbildung 3-10).

Bei 4 der insgesamt 10 untersuchten Spender (9, 27, 29 und 30) führte die Verwendung der Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 verglichen mit dem Epitop

P1wt zu einem völligen Verlust der proliferativen T-Zellantwort. PBL der verbleibenden 6 Spender (2, 5, 10, 19, 23, 26) hingegen zeigten auch nach antigener Stimulation mit diesen drei Epitopvarianten eine positive T-Zell-Reaktivität.

Die weiteren Aminosäureaustausche, die durch die Varianten P1/M1 - P1/M6, sowie P1/M8 - P1/M10 repräsentiert wurden, hatten dagegen bei keinem der untersuchten Spender einen derart drastischen Einfluß auf die Reaktivität der vorhandenen HBsAg-spezifischen T-Zellen.



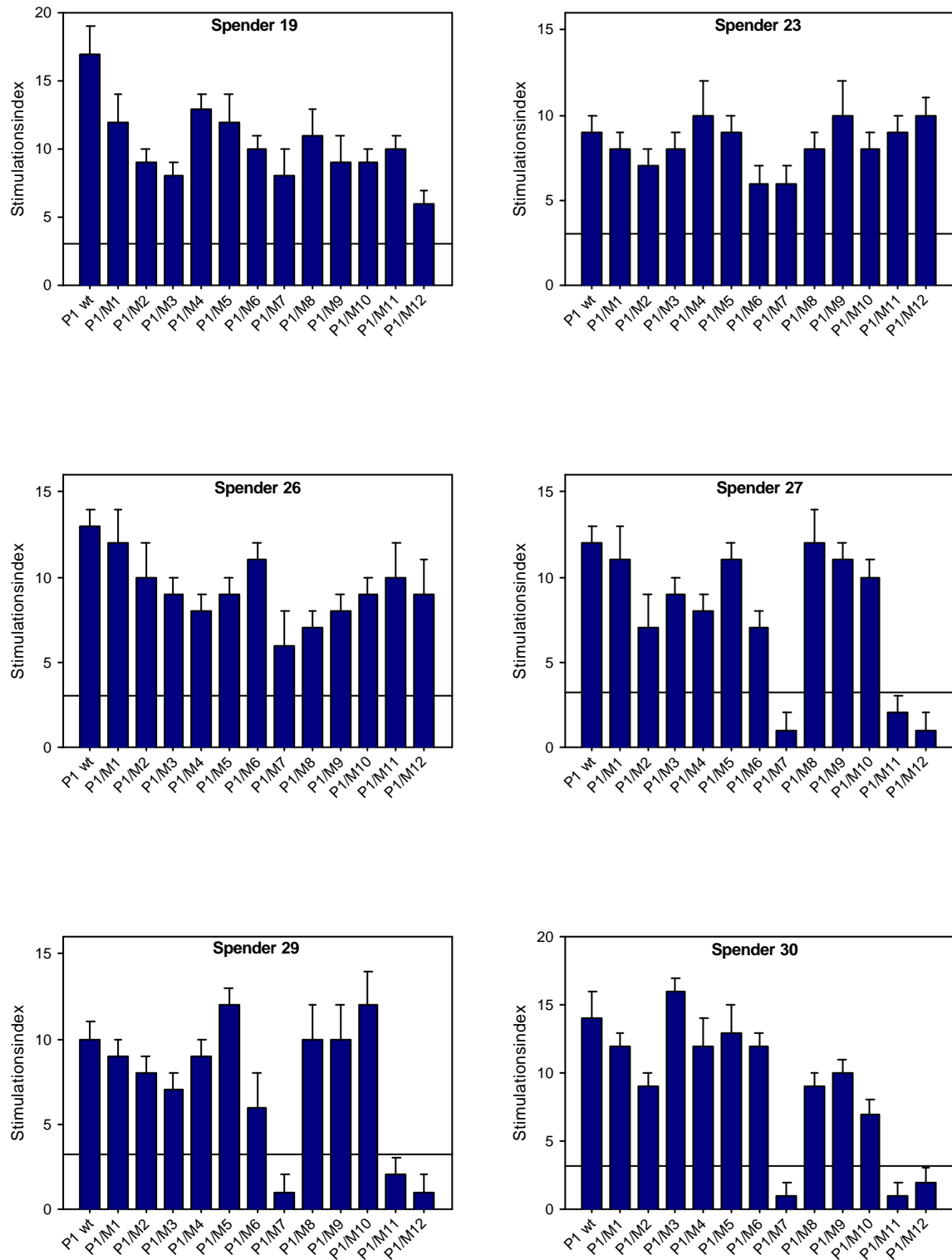


Abbildung 3-10: Stimulatorische Eigenschaften der P1-Epitopvarianten.

1×10^5 Zellen/Ansatz wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptid P1wt oder einer der P1wt-Varianten (P1/M1- P1/M12) stimuliert (siehe 2.2.3.1). Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationindices [SI], wobei ein $\text{SI} \geq 3$ als positiv gewertet wurde (Linie). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Eine unspezifische Lymphozytenproliferation wurde durch Verwendung des HIV-Kontrollpeptids ermittelt und lag in allen Versuchen bei ≤ 3 .

Das völlig überraschende Ergebnis dieser Versuche war, daß nur T-Helferzellen von vier der 10 Spender einen Verlust der T-Zellreaktivität zeigten. Zu erwarten wäre eine vergleichbare Reaktion aller Spender gewesen. Offensichtlich werden die Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 durch T-Zellen der untersuchten Spender mit unterschiedlicher Effektivität erkannt.

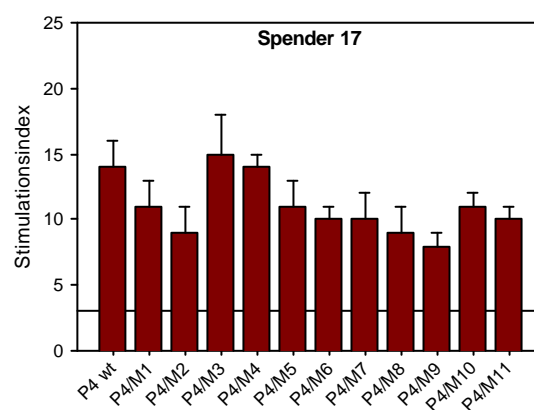
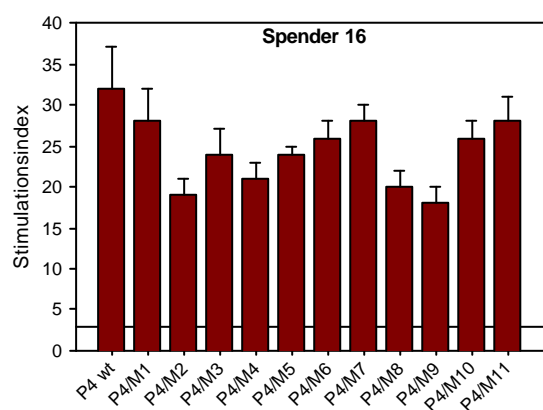
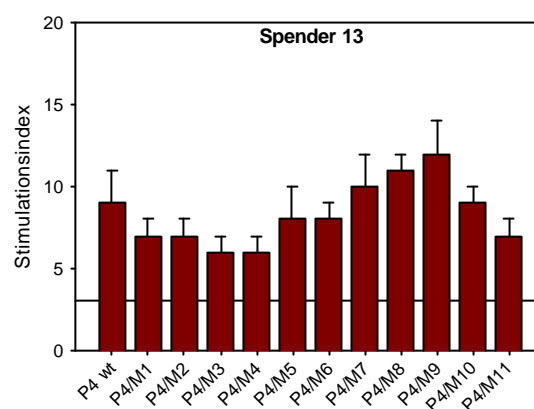
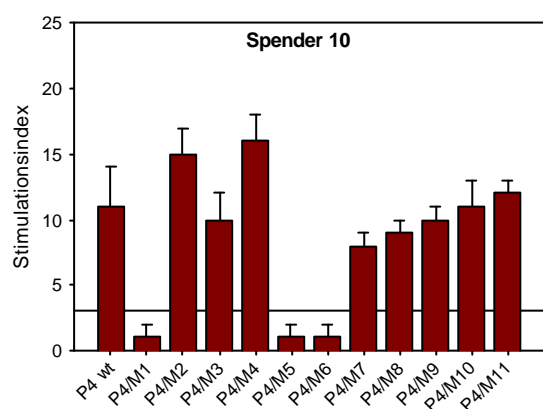
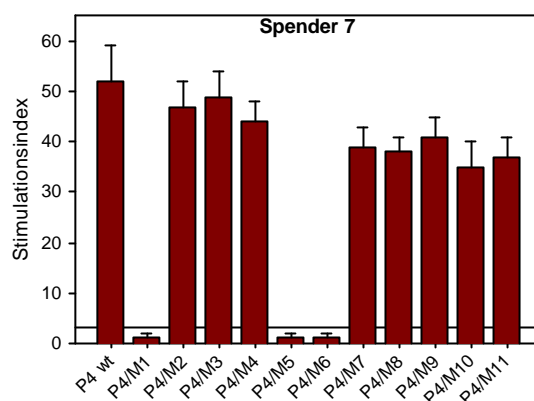
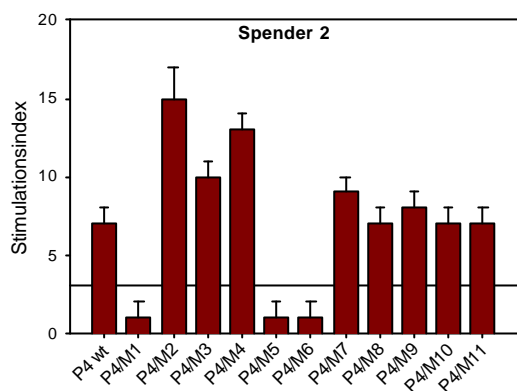
3.3.3.2 Varianten des Epitops P4wt

Für Epitop P4wt zeigten ebenfalls PBL von 10 der 30 untersuchten Spender eine positive T-Zellreaktion (Tab. 3-1). Die natürlich vorkommenden Varianten dieses Epitops (Tab. 3-6) wurden in nachfolgenden Experimenten auf ihre stimulatorische Kapazität hin untersucht.

Analog zu P1wt konnten auch im Fall der P4wt-abgeleiteten Varianten P4/M1-P4/M11 einzelne identifiziert werden, durch die die vorhandene HBsAg-spezifische T-Zellantwort nicht induziert wird. Wie bereits für Varianten des Epitops P1wt gezeigt, waren auch hier nur einzelne Spender von diesem Ausfall der T-Zellantwort betroffen (Abb. 3-11).

Stimulation von PBL mit den Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6 löste bei den Spendern 2, 7, 10 und 26 keine proliferative T-Zellantwort aus.

Bei den verbleibenden 6 untersuchten Spendern wurden dagegen bei Verwendung von P4/M1, P4/M5 und P4/M6 Stimulationsindices gemessen, die vergleichbar mit den für P4wt erzielten waren. Die Varianten werden demnach im Fall der Spender 13, 16, 17, 19, 27 und 30 effektiv präsentiert und durch vorhandene spezifische T-Zellen erkannt. Die Varianten P4/M2 – P4/M4, sowie P4/M7 – P4/M11 induzierten dagegen bei PBL aller 10 untersuchten Spender eine signifikante proliferative T-Zellantwort.



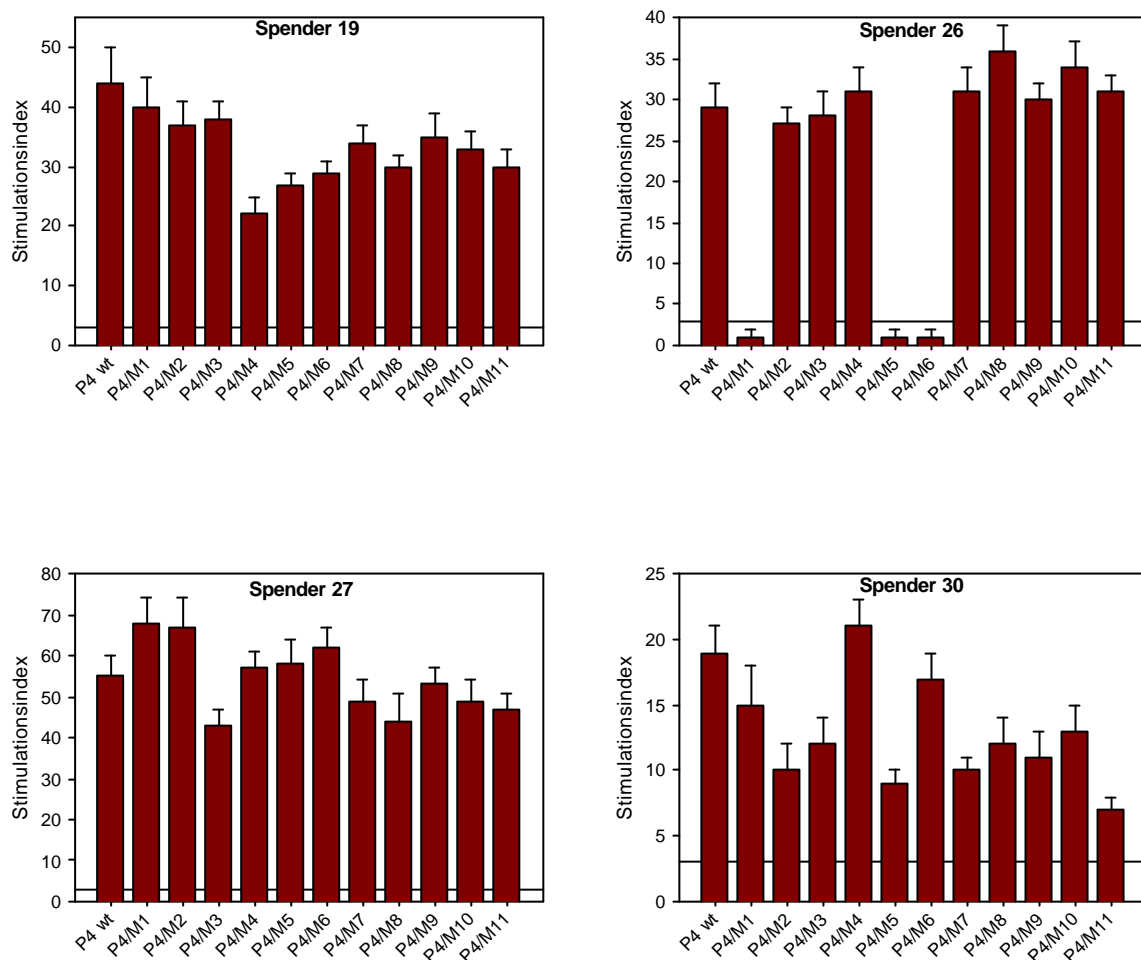


Abbildung 3-11: Stimulatorische Kapazität der P4wt-Epitopvarianten.

1×10^5 Zellen/Ansatz wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Wildtyp-Peptid P4wt oder einer der Epitopvarianten (P4/M1-P4/M11) stimuliert (siehe 2.2.3.1). Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI] wobei $\text{SI} \geq 3$ als positiv gewertet wurden (Linie). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Die unspezifische Lymphozytenproliferation wurde durch Verwendung des HIV-Kontrollpeptids ermittelt und lag in allen Versuchen bei ≤ 3 .

Somit existieren sowohl für das Epitops P1wt, als auch auch für das zweite Epitop P4wt natürlich vorkommende Varianten die nicht in der Lage sind eine entsprechende Reaktion impfinduzierter HBsAg-spezifischer T-Helferzellen auszulösen.

3.3.4 Dosisabhängigkeit der stimulatorischen Kapazität der P1wt- und P4wt-Epitop-Varianten

Eine erste Vermutung hinsichtlich der Ursache der veränderten stimulatorischen Kapazität einzelner Epitopvarianten war, daß die Affinität des entsprechenden Peptids zu den korrespondierenden MHC-Molekülen reduziert ist. In diesem Fall könnte möglicherweise durch höhere Peptidkonzentrationen eine Reaktion der T-Zellen induziert werden.

3.3.4.1 P1wt-Varianten

Um dies auszuschließen, wurden PBL der betroffenen Spender (9, 27, 29 und 30) in Proliferationsassays mit steigenden Peptidkonzentrationen der drei Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 stimuliert und im Vergleich zum Epitop P1wt nochmals getestet (Abb. 3-12). Parallel zu den vier Spendern wurden auch PBL eines Spenders getestet, bei dem keine Unterschiede bezüglich der Immunogenität der einzelnen Epitop-Varianten zu beobachten war (Abb. 3-12; Spender 19).

Diese Versuche ergaben jedoch, daß selbst eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf das 5fache der Standardkonzentration keine positive T-Zellreaktion induzieren konnte. Es zeigte sich ein typischer Sättigungsverlauf in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration, der die standardmäßig eingesetzte Konzentration von 20 µg/ml Peptid nochmals bestätigte. Eine nur quantitativ reduzierte Bindung der veränderten Peptide an die MHC-Moleküle war demnach als Ursache der unterschiedlichen stimulatorischen Kapazität der Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 auf PBL der Spender 9, 27, 29 und 30 auszuschließen.

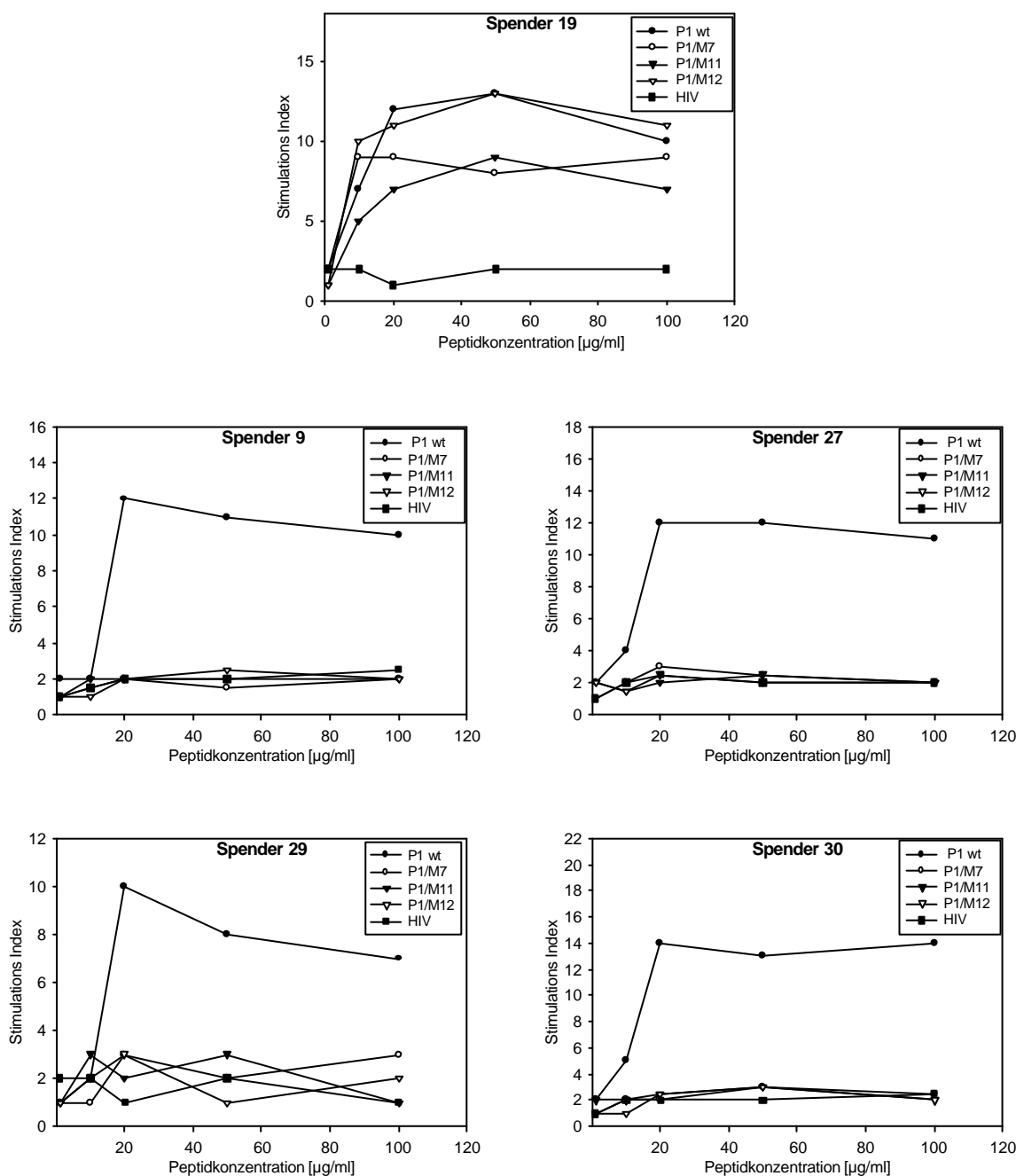


Abbildung 3-12: Stimulatorische Kapazität der P1wt-Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 in Abhängigkeit der Peptidkonzentration.

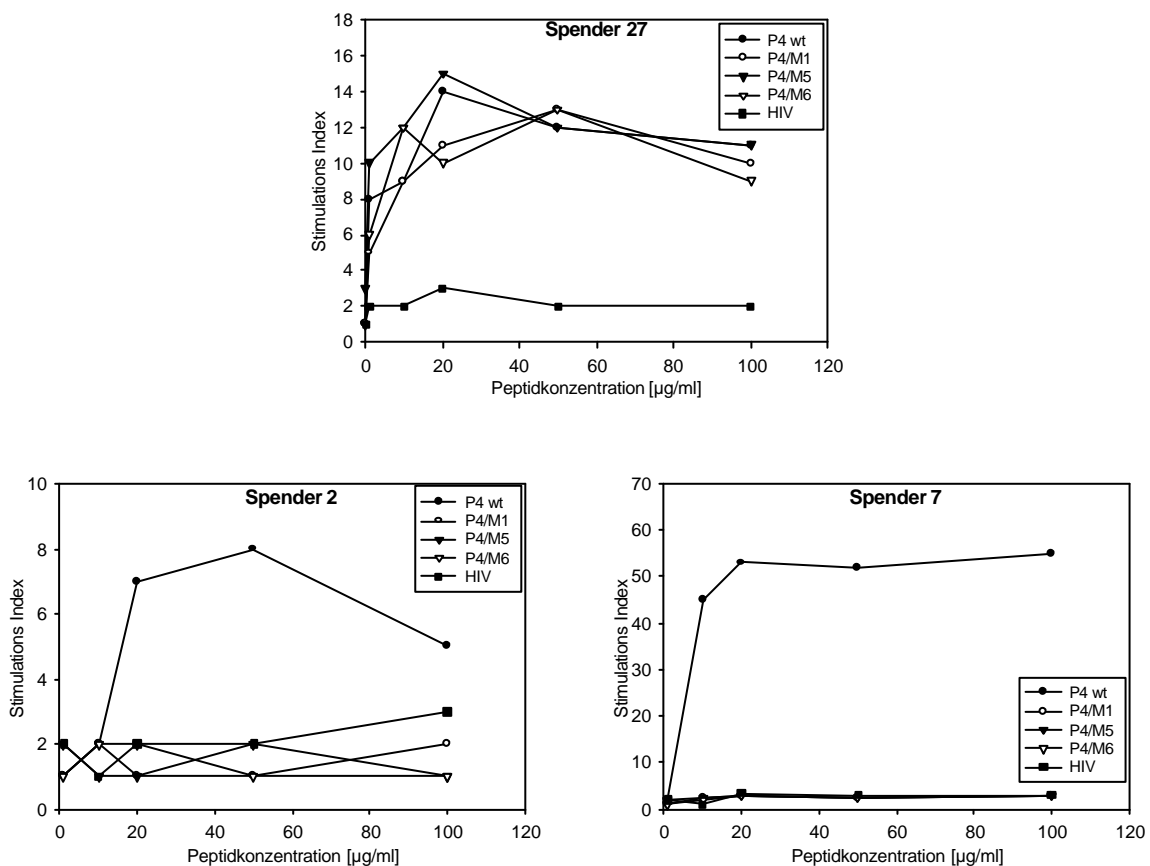
1×10^5 Zellen/Ansatz wurden mit steigenden Konzentrationen an Wildtyp-Peptid P1wt oder einer der Varianten mit veränderter Immunogenität (P1/M7, P1/M11, P1/M12) stimuliert (siehe 2.2.3.1). Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI], wobei $SI \geq 3$ als positiv gewertet wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Zur Kontrolle wurden steigende Konzentrationen eines HIV-Peptids eingesetzt (HIV).

3.3.4.2 P4wt-Varianten

Auch im Fall der P4wt-Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6, die keine T-Zellproliferation induzieren, sollte eine geringere Affinität der entsprechenden Peptide zum korrespondierenden MHC-Molekül als Ursache der fehlenden Immunogenität der Epitopvarianten ausgeschlossen werden (Abb. 3-13).

Ein derartiger konzentrationsabhängiger Effekt wurde nicht bestätigt. Analog zu den für P1wt-Varianten gezeigten Daten, induzierte auch hier eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf das 5fache der Ausgangskonzentration keine Proliferation HBsAg-spezifischer T-Helferzellen.

PBL des Spenders 27, bei dem keine Unterschiede in der Immunogenität der Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M7 im Vergleich zu P4wt bestand, wurden unter denselben Bedingungen getestet. Die für die Versuche verwendete Peptidkonzentration von 20 µg/ml erwies sich auch hier als optimal.



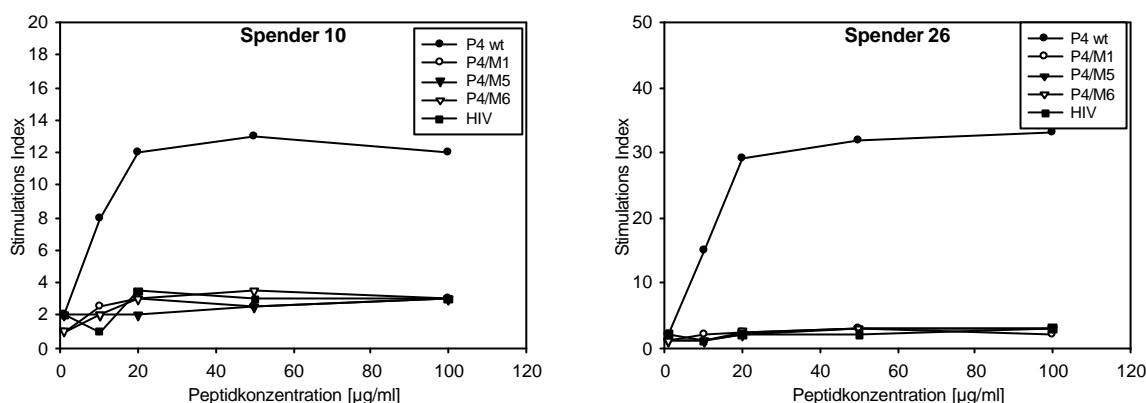


Abbildung 3-13 Stimulatorische Kapazität der P4wt-Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6 in Abhängigkeit der Peptidkonzentration. 1×10^5 Zellen/Ansatz wurden mit steigenden Konzentrationen an Peptid P4wt oder einer der Varianten mit veränderter Immunogenität (P4/M1, P4/M5 und P4/M6) stimuliert (siehe 2.2.3.1). Die T-Zellproliferation ist wiedergegeben in Stimulationsindices [SI], wobei $SI \geq 3$ als positiv gewertet wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Zur Kontrolle wurden steigende Konzentrationen eines HIV-Peptids eingesetzt (HIV).

3.3.5 Zytokinsekretion HBsAg-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit P1wt- und P4wt-Varianten

Der überraschende Befund, daß die Epitop-Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 sowie P4/M1, P4M5 und P4/M6 auf T-Helferzellen einzelner Spender eine variable stimulatorische Kapazität besitzen, sollte in einem weiteren Testsystem bestätigt werden.

In nachfolgenden Elispot-Experimenten wurde daher charakterisiert, inwieweit einzelne Epitop-Varianten die Zytokinsekretion HBsAg-spezifischen T-Helferzellen beeinflussen. Hierfür erfolgte für jede Epitop-Variante die Quantifizierung der durch sie induzierten IFN- γ -sezernierenden T-Zellen im Standard-Elispot.

3.3.5.1 Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit P1wt-Varianten

Die Versuche bestätigten die Ergebnisse der Proliferationsassays hinsichtlich der unterschiedlichen Immunogenität der Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12. Die Stimulation von PBL mit diesen drei Varianten beeinflusste wiederum lediglich die T-Zellantwort der Spendern 9, 27, 29 und 30. PBL der verbleibenden 6 Spender zeigten als Reaktion auf P1/M7, P1/M11 und P1/M12 vergleichbare Zahlen IFN- γ -sezernierender T-Zellen (Tab. 3-6).

Während bei den Spendern 9, 27, 29 und 30 die Frequenz der detektierbaren zytokinsezernierenden T-Zellen bei Verwendung der Varianten P1/M1 - P1/M6 bzw. P1/M8 - P1/M10 im Schnitt bei etwa 1/30000 (Spender 9), 1/26000 (Spender 27 und 30) sowie 1/29000 (Spender 29) lag, konnten nach Stimulation mit den Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 lediglich einzelne aktivierte T-Zellen (etwa 1/100000) detektiert werden. Diese Zahl wurde ebenfalls mit dem Kontroll-Peptid erreicht und kann somit als unspezifisch angesehen werden.

Vergleichbar den Daten aus den Proliferationsassays hatten die weiteren P1wt-Varianten bei den verbleibenden 6 Spendern keinen signifikanten Einfluß auf die Zahl der durch sie stimulierten IFN- γ -sezernierenden T-Zellen.

Tabelle 3-6: Frequenzanalyse HBsAg-spezifischer, reaktiver T-Zellen nach antigener Stimulation mit Varianten des Epitops P1wt*

Antigen	Spender 2	Spender 5	Spender 9	Spender 10	Spender 19	Spender 23	Spender 26	Spender 27	Spender 29	Spender 30
P1 wt	32 ± 2	26 ± 3	32 ± 3	30 ± 2	26 ± 3	26 ± 3	30 ± 3	45 ± 4	34 ± 3	37 ± 4
P1/M1	27 ± 3	19 ± 2	27 ± 2	29 ± 3	20 ± 2	21 ± 2	22 ± 3	39 ± 3	30 ± 3	32 ± 3
P1/M2	29 ± 3	21 ± 2	29 ± 3	24 ± 2	21 ± 2	20 ± 4	26 ± 3	34 ± 2	31 ± 2	33 ± 3
P1/M3	35 ± 2	23 ± 3	35 ± 2	29 ± 2	19 ± 2	26 ± 2	24 ± 3	30 ± 3	32 ± 4	29 ± 2
P1/M4	35 ± 4	19 ± 2	23 ± 4	30 ± 3	23 ± 2	27 ± 3	28 ± 3	37 ± 4	29 ± 2	28 ± 3
P1/M5	33 ± 3	25 ± 2	21 ± 2	31 ± 4	17 ± 2	26 ± 2	19 ± 2	33 ± 2	34 ± 3	30 ± 2
P1/M6	33 ± 2	22 ± 2	33 ± 4	30 ± 4	19 ± 2	25 ± 3	22 ± 2	30 ± 3	30 ± 3	33 ± 3
P1/M7	36 ± 3	23 ± 3	10 ± 2	32 ± 3	20 ± 3	20 ± 3	24 ± 3	13 ± 2	9 ± 1	9 ± 1
P1/M8	29 ± 3	24 ± 2	29 ± 2	35 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	23 ± 2	32 ± 3	29 ± 2	35 ± 4
P1/M9	37 ± 2	19 ± 3	37 ± 4	31 ± 2	23 ± 3	25 ± 3	20 ± 2	33 ± 3	34 ± 3	30 ± 3
P1/M10	24 ± 2	23 ± 2	24 ± 3	30 ± 3	22 ± 3	24 ± 3	23 ± 2	37 ± 4	30 ± 3	31 ± 4
P1/M11	29 ± 2	21 ± 2	9 ± 1	29 ± 4	29 ± 2	23 ± 2	24 ± 3	9 ± 2	11 ± 2	12 ± 2
P1/M12	31 ± 3	20 ± 3	12 ± 2	27 ± 2	27 ± 3	27 ± 2	23 ± 2	10 ± 2	10 ± 2	9 ± 1
HIV	9 ± 1	7 ± 2	11 ± 2	5 ± 3	9 ± 2	8 ± 2	12 ± 2	11 ± 2	9 ± 2	11 ± 1

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit 20 µg/ml Peptid (P1wt bzw. den davon abgeleiteten Varianten P1/M1 – P1/M12) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im Zytokin-Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. (signifikante Reduktion der Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen: Fettdruck, grau unterlegt). Als unspezifisches Kontrollpeptids wurde ein HIV-Peptid verwendet

3.3.5.2 Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit P4wt-Varianten

Auch die, einzelne Spender betreffende, fehlende stimulatorische Kapazität der P4wt-Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6, sollte durch ein zweites Testsystem überprüft werden. Analog zu 3.3.5.1 wurde für jede P4wt-Variante die Zahl der durch sie aktivierten HBsAg-spezifischen T-Helferzellen im INF-Elispot bestimmt (Tab. 3-7).

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen dabei auch in diesem Fall die zuvor gezeigten Daten aus den Proliferationsassays. Bei den Spendern 2, 7, 10 und 26 wurde unter Verwendung der Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M7 eine deutlich geringere Zahl an vorhandenen HBsAg-spezifischen T-Zellen aktiviert. Im Gegensatz dazu war die Zahl an INF- γ produzierenden Zellen für die verbleibenden P4-Varianten bei allen Spendern nicht signifikant reduziert.

Für das Epitop P4wt sowie für die Varianten P4/M2 – P4/M4 und P4/M7 – P4/M11 wurden durchschnittliche Frequenzen IFN- γ -sezernierender Zellen von etwa 1/29000 (Spender 2), 1/20000 (Spender 7), 1/27000 (Spender 10) und sowie 1/22000 (Spender 26) gemessen. Die Stimulation mit den Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M7 hingegen aktivierte keine signifikante Zytokinsekretion bei PBL dieser Spender. Die Werte lagen jeweils im Bereich der für das Kontrollpeptid erzielten Werte. Wiederum waren bei den verbleibenden 6 Spendern keine Unterschiede zu beobachten.

Tabelle 3-7: Frequenzanalyse HBsAg-spezifischer, reaktiver T-Zellen nach antigener Stimulation mit Varianten des Epitops P4wt*

Antigen	Spender 2	Spender 7	Spender 10	Spender 13	Spender 16	Spender 17	Spender 19	Spender 26	Spender 27	Spender 30
P4 wt	38 ± 3	57 ± 4	39 ± 3	49 ± 3	51 ± 3	51 ± 5	57 ± 2	49 ± 4	39 ± 1	33 ± 2
P4/M1	3 ± 0	5 ± 1	4 ± 0	48 ± 2	49 ± 2	47 ± 2	50 ± 2	4 ± 2	37 ± 3	31 ± 2
P4/M2	35 ± 2	49 ± 3	40 ± 2	40 ± 3	48 ± 5	40 ± 2	50 ± 4	55 ± 4	40 ± 2	37 ± 2
P4/M3	33 ± 3	46 ± 4	37 ± 3	46 ± 2	44 ± 2	41 ± 4	47 ± 4	49 ± 3	33 ± 3	39 ± 4
P4/M4	34 ± 3	40 ± 5	38 ± 4	39 ± 3	39 ± 3	37 ± 2	34 ± 5	35 ± 4	31 ± 2	30 ± 3
P4/M5	3 ± 1	3 ± 2	2 ± 1	42 ± 3	57 ± 2	48 ± 4	36 ± 2	5 ± 1	37 ± 1	29 ± 2
P4/M6	4 ± 1	6 ± 1	3 ± 1	48 ± 3	50 ± 3	43 ± 2	43 ± 1	2 ± 2	39 ± 2	34 ± 3
P4/M7	30 ± 2	48 ± 4	35 ± 2	46 ± 2	49 ± 4	42 ± 2	44 ± 3	46 ± 2	35 ± 4	38 ± 2
P4/M8	31 ± 2	46 ± 2	39 ± 3	47 ± 5	44 ± 2	44 ± 4	39 ± 2	42 ± 3	36 ± 3	35 ± 2
P4/M9	32 ± 3	49 ± 3	30 ± 2	43 ± 3	46 ± 5	39 ± 2	48 ± 3	46 ± 4	48 ± 5	28 ± 3
P4/M10	37 ± 2	53 ± 2	34 ± 2	44 ± 2	47 ± 3	47 ± 3	42 ± 5	47 ± 3	46 ± 2	36 ± 2
P4/M11	36 ± 2	55 ± 2	35 ± 2	42 ± 2	40 ± 2	37 ± 2	40 ± 3	50 ± 2	37 ± 3	37 ± 3
HIV	6 ± 2	7 ± 2	5 ± 2	9 ± 2	8 ± 2	5 ± 2	6 ± 1	9 ± 2	5 ± 0	8 ± 2

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit 20 µg/ml Peptid (P4wt bzw. den davon abgeleiteten Varianten P4/M1 – P4/M11) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im Zytokin-Elisot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Fettdruck, grau unterlegt). Als unspezifisches Kontrollpeptids wurde ein HIV-Peptid verwendet

3.3.6 Charakterisierung der Aminosäureaustausche der untersuchten Epitop-Varianten

Die veränderte Immunogenität einzelner, natürlich auftretender Varianten der Epitope P1wt und P4wt kann vermutlich in beiden Fällen auf einen speziellen Aminosäureaustausch zurückgeführt werden.

Mit Blick auf die Sequenz der nicht-stimulatorisch wirkenden Varianten des Epitops P1wt zeigt sich, daß die drei Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 einen Aminosäureaustausch an Position 21 aufweisen. Bei P1/M7 ist demnach das im Epitop P1wt vorhandene Leu durch Trp, bei den Varianten P1/M11 und P1/M12 durch Ser ersetzt. Die in P1/M11 und P1/M12 weiterhin enthaltenen Austausche an Position 24 (Arg→Lys) bzw. Position 30 (Gln→Leu) können nicht die alleinige Ursache der verminderten Reaktivität sein, da diese in den Varianten P1/M1 (Arg→Lys) und P1/M2 (Gln→Leu) und P1/M3 (Arg→Lys, Gln→Leu) ebenfalls vorhanden sind und in dieser Form keinen signifikanten Einfluß auf die T-Zellantwort zeigen.

Ein vergleichbarer Zusammenhang besteht auch im Fall der von P4wt abgeleiteten Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M7, denen ein Aminosäureaustausch an Position 220 gemeinsam ist, der die Ursache der reduzierten Immunogenität zu sein scheint. Während sich im Epitop P4wt an dieser Position die Aminosäure Phe findet, ist diese in den Varianten durch Trp (P4/M1) bzw. Cys (P4/M5 und P4/M6) ersetzt. Auch hier können die in den Varianten P4/M5 und P4/M6 zusätzlich auftretenden Aminosäureaustausche (Position 224: Val→Ala; Position 225: Tyr→Ser) nicht verantwortlich sein, da sie in Varianten präsent sind (P4/M9, P4/M10), die keinen Einfluß auf die T-Zell-Reaktivität zeigten.

In weiteren Untersuchungen sollte nun mit Hilfe alaninsubstituierter Peptide im Elispot abgeklärt werden, welche Aminosäurepositionen innerhalb der beiden Epitope für deren Präsentation und Erkennung essentiell sind. Hierbei erfolgt der individuelle Austausch jeder einzelnen Aminosäure des entsprechenden Epitops gegen die sterische und elektrostatisch neutrale Aminosäure Alanin (Tab. 2-4 und 2-5). Die

entsprechenden Elipots wurden unter Standardbedingungen (1×10^5 PBL/Ansatz, 20 µg/ml Peptid) durchgeführt.

Bei gleichbleibender Reaktivität der Epitopvarianten kann davon ausgegangen werden, daß die entsprechende Aminosäure keine essentiell wichtige Ankerposition darstellt. Sollte die Zahl reaktiver T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp-Peptid signifikant geringer sein, ist die entsprechende Aminosäure für die Bindung an das korrespondierende MHC-Molekül oder aber die Erkennung durch T-Zellrezeptor von entscheidender Bedeutung.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in den nachfolgenden Abbildungen am Beispiel von jeweils 2 Spender des untersuchten Kollektivs graphisch dargestellt (eine Übersicht über alle Ergebnisse gibt für Epitop P1wt Tab. 3-8 bzw. für Epitop P4wt Tab. 3-9). Zellen des Spenders 2 reagierten mit allen untersuchten P1wt-Varianten, wohingegen sie durch die P4wt-Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6 nicht aktiviert wurden. PBL des Spenders 30 zeigte keine Reaktion auf die P1wt-abgeleiteten Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 jedoch auf alle untersuchten P4wt-Varianten. PBL von Spender 30 zeigen bei einigen der alaninsubstituierten Peptide deutlich reduzierte bzw. völlig fehlende Reaktivität (Abb. 3-14). Neben, der bereits als kritische Position bestimmten Aminosäure 21 führen auch Austausche an Position 20, 22, und 28 zum Verlust der T-Zell-Reaktivität, Austausche an Position 24 und 27 führen zu verminderter stimulatorischer Kapazität.

Es existieren keine natürlich vorkommenden Varianten, die an den Positionen 20, 22 und 28 einen Aminosäureaustausch aufweisen. Für die weniger kritischen Positionen 24 und 27 hingegen finden sich Varianten mit veränderten Aminosäuresequenzen. Da jedoch ein Austausch an Position 24 von Arg→Lys in 8 der 12 untersuchten Varianten vertreten ist, handelt es sich hierbei um eine nicht-essentielle Ankerposition innerhalb des Epitops, oder aber der Austausch wird toleriert.

Keines der getesteten alaninsubstituierten Peptide führte bei Spender 2 zu einem völligen Verlust der T-Zell-Reaktivität. Lediglich eine geringe Reduzierung der für P1wt gemessenen Frequenzen und aktivierten T-Zellen wurde festgestellt.

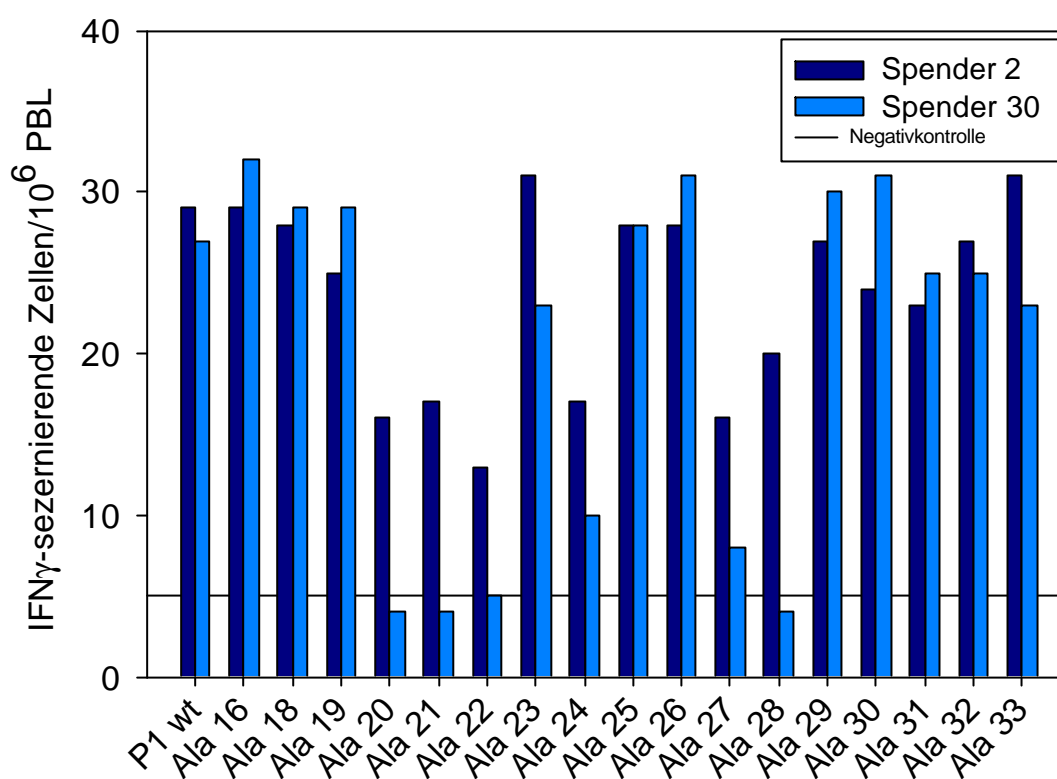


Abbildung 3-14: Charakterisierung von Ankerpositionen innerhalb des Epitops P1wt.

PBL wurden mit P1wt oder davon abgeleiteten Alaninsubstituierten Peptiden (Ala 16-Ala 33; die Zahl gibt die Position der Alaninsubstitution an) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im IFN- γ -Elispotassays ermittelt (siehe 2.2.3.2). Gezeigt sind Mittelwerte IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Unspezifische Zytokinsekretion wurde durch Verwendung des HIV-Kontrollpeptids ermittelt (Linie).

Auch für die Epitop P4wt-Varianten ergaben sich unterschiedliche stimulatorische Kapazität der einzelnen alaninsubstituierten Peptide (Abb. 3-15). PBL von Spender 2 zeigten nach antigener Stimulation mit den Peptiden Ala 216, 220, 222 und 223 keine Reaktivität HBsAg-spezifischer T-Zellen, wohingegen bei Spender 30 auch auf diese Peptide eine Reaktion gemessen wurden, die allerdings ebenfalls weniger stark ausgeprägt war.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei den Positionen 216, 220, 222 und 223 um essentielle Ankerpositionen innerhalb des Epitops P4wt handelt. Mit Ausnahme von Position 220 findet man an diesen Positionen in den untersuchten Epitop-Varianten auch keine natürlich vorkommenden Aminosäureaustausche.

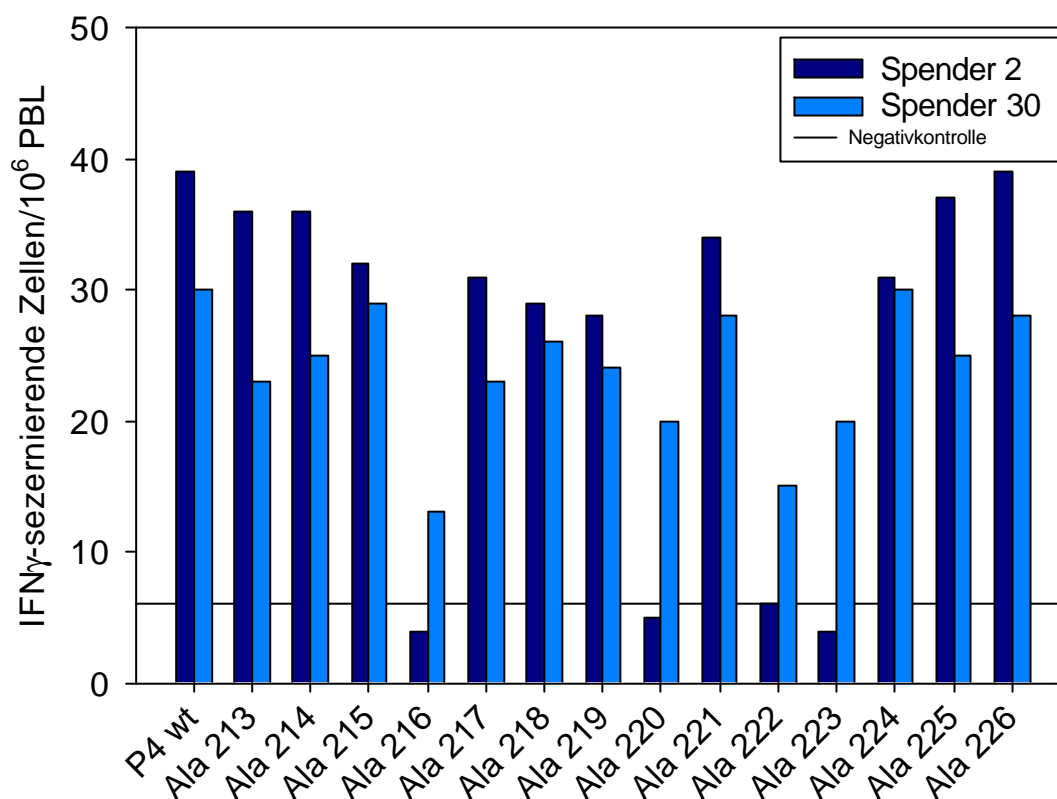


Abbildung 3-15: Charakterisierung von Ankerpositionen innerhalb des Epitops P4wt.

PBL wurden mit P4wt oder davon abgeleiteten alaninsubstituierten Peptiden (Ala 213-Ala 226; die Zahl gibt die Position der Alaninsubstitution an) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im IFN- γ - Elispotassay ermittelt (siehe 2.2.3.2). Gezeigt sind Mittelwerte IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde. Die unspezifische Zytokinsekretion wurde durch Verwendung des HIV-Kontrollpeptids ermittelt (Linie).

Tabelle 3-8: Anzahl IFN- γ -sezernierender spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit alaninsubstituierten P1wt-Peptiden *

Spender										
Peptid	2	5	9	10	19	23	26	27	29	30
P1wt	32 \pm 2	26 \pm 3	32 \pm 3	30 \pm 2	26 \pm 3	26 \pm 3	30 \pm 3	45 \pm 4	34 \pm 3	27 \pm 4
Ala 16	29 \pm 3	23 \pm 3	29 \pm 3	27 \pm 2	19 \pm 2	28 \pm 4	29 \pm 3	43 \pm 2	29 \pm 2	32 \pm 3
Ala 18	28 \pm 4	20 \pm 3	27 \pm 2	29 \pm 2	22 \pm 2	26 \pm 2	33 \pm 3	46 \pm 3	28 \pm 4	29 \pm 4
Ala 19	25 \pm 3	21 \pm 2	19 \pm 4	25 \pm 3	27 \pm 2	22 \pm 3	31 \pm 3	39 \pm 4	36 \pm 2	29 \pm 3
Ala 20	16 \pm 3	17 \pm 2	5 \pm 2	21 \pm 4	19 \pm 2	17 \pm 2	20 \pm 2	3 \pm 2	5 \pm 3	4 \pm 2
Ala 21	17 \pm 2	19 \pm 4	9 \pm 4	19 \pm 4	21 \pm 2	20 \pm 3	29 \pm 2	6 \pm 3	6 \pm 3	4 \pm 2
Ala 22	13 \pm 3	20 \pm 3	6 \pm 2	27 \pm 3	23 \pm 3	19 \pm 3	30 \pm 3	8 \pm 2	3 \pm 1	5 \pm 2
Ala 23	31 \pm 4	29 \pm 1	27 \pm 2	28 \pm 2	26 \pm 2	22 \pm 2	33 \pm 2	42 \pm 3	33 \pm 2	23 \pm 2
Ala 24	17 \pm 2	26 \pm 3	23 \pm 4	33 \pm 2	21 \pm 3	28 \pm 3	32 \pm 2	37 \pm 3	31 \pm 3	10 \pm 2
Ala 25	28 \pm 4	22 \pm 2	22 \pm 3	19 \pm 3	20 \pm 3	21 \pm 3	34 \pm 2	35 \pm 4	27 \pm 3	28 \pm 3
Ala 26	28 \pm 3	27 \pm 2	28 \pm 1	23 \pm 4	22 \pm 2	24 \pm 2	27 \pm 3	9 \pm 2	29 \pm 2	31 \pm 4
Ala 27	16 \pm 2	21 \pm 3	9 \pm 2	25 \pm 2	29 \pm 3	23 \pm 2	25 \pm 2	15 \pm 2	19 \pm 2	8 \pm 3
Ala 28	20 \pm 2	19 \pm 2	6 \pm 2	24 \pm 3	25 \pm 2	25 \pm 2	21 \pm 2	18 \pm 2	21 \pm 2	4 \pm 2
Ala 29	27 \pm 3	19 \pm 2	22 \pm 3	22 \pm 2	22 \pm 2	22 \pm 4	22 \pm 3	41 \pm 2	30 \pm 2	30 \pm 4
Ala 30	24 \pm 2	17 \pm 2	23 \pm 2	25 \pm 2	19 \pm 2	26 \pm 2	28 \pm 2	40 \pm 3	31 \pm 2	31 \pm 3
Ala 31	23 \pm 3	19 \pm 3	29 \pm 4	27 \pm 2	24 \pm 3	28 \pm 3	31 \pm 2	41 \pm 3	26 \pm 3	25 \pm 3
Ala 32	27 \pm 3	22 \pm 2	27 \pm 3	26 \pm 3	22 \pm 3	27 \pm 3	33 \pm 2	45 \pm 4	28 \pm 3	25 \pm 3
Ala 33	31 \pm 4	21 \pm 2	29 \pm 1	29 \pm 4	27 \pm 2	23 \pm 2	29 \pm 3	39 \pm 2	26 \pm 2	23 \pm 3
HIV	9 \pm 3	5 \pm 2	4 \pm 1	6 \pm 2	7 \pm 2	9 \pm 2	6 \pm 3	9 \pm 2	7 \pm 2	9 \pm 3

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptid (P1wt bzw. den davon abgeleiteten alaninsubstituierten Varianten Ala16 – Ala33) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im Zytokin-Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 Replikaten. (Reduktion der Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen verglichen mit dem Epitop P1wt $\geq 50\%$: Fettdruck, grau unterlegt). Als unspezifisches Kontrollpeptid wurde ein HIV-Peptid verwendet. Spender, bei denen die reduzierte Immunogenität der Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 charakterisiert wurde sind rot markiert.

Tabelle 3-9: Anzahl IFN- γ -sezernierender spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit alaninsubstituierten P4wt-Peptiden*

Spender										
Peptid	2	7	10	13	16	17	19	26	27	30
P4wt	39 \pm 5	26 \pm 3	32 \pm 3	30 \pm 2	26 \pm 3	26 \pm 3	30 \pm 3	45 \pm 4	34 \pm 3	30 \pm 3
Ala 213	36 \pm 4	22 \pm 2	29 \pm 2	27 \pm 4	22 \pm 3	27 \pm 3	33 \pm 2	47 \pm 4	29 \pm 3	23 \pm 3
Ala 214	36 \pm 4	26 \pm 3	27 \pm 2	29 \pm 3	24 \pm 3	26 \pm 3	29 \pm 3	41 \pm 4	33 \pm 3	25 \pm 3
Ala 215	32 \pm 3	25 \pm 4	31 \pm 3	25 \pm 5	26 \pm 2	19 \pm 4	27 \pm 3	40 \pm 2	29 \pm 2	29 \pm 2
Ala 216	4 \pm 2	5 \pm 3	6 \pm 2	30 \pm 2	21 \pm 2	21 \pm 3	22 \pm 2	7 \pm 3	31 \pm 2	13 \pm 2
Ala 217	31 \pm 3	29 \pm 2	30 \pm 3	26 \pm 2	20 \pm 3	19 \pm 3	31 \pm 4	37 \pm 2	30 \pm 3	23 \pm 3
Ala 218	29 \pm 4	21 \pm 3	32 \pm 2	31 \pm 4	22 \pm 4	30 \pm 2	28 \pm 3	33 \pm 4	29 \pm 4	26 \pm 4
Ala 219	28 \pm 3	22 \pm 3	29 \pm 2	32 \pm 1	19 \pm 4	26 \pm 2	22 \pm 2	41 \pm 2	33 \pm 2	24 \pm 3
Ala 220	5 \pm 3	6 \pm 2	7 \pm 2	20 \pm 3	19 \pm 2	21 \pm 4	19 \pm 2	5 \pm 2	21 \pm 2	20 \pm 3
Ala 221	34 \pm 4	27 \pm 4	27 \pm 1	29 \pm 3	26 \pm 2	27 \pm 4	29 \pm 3	40 \pm 3	26 \pm 4	28 \pm 4
Ala 222	6 \pm 2	5 \pm 1	8 \pm 2	21 \pm 2	20 \pm 2	22 \pm 2	30 \pm 3	3 \pm 1	22 \pm 2	15 \pm 2
Ala 223	4 \pm 3	7 \pm 3	7 \pm 3	19 \pm 4	25 \pm 2	26 \pm 2	25 \pm 2	7 \pm 3	28 \pm 3	20 \pm 3
Ala 224	31 \pm 3	24 \pm 2	29 \pm 3	26 \pm 3	22 \pm 5	21 \pm 3	22 \pm 3	41 \pm 1	26 \pm 2	30 \pm 4
Ala 225	37 \pm 5	25 \pm 3	31 \pm 3	31 \pm 2	27 \pm 2	22 \pm 2	29 \pm 3	36 \pm 3	33 \pm 4	25 \pm 3
Ala 226	39 \pm 4	26 \pm 2	27 \pm 3	22 \pm 4	19 \pm 2	19 \pm 2	31 \pm 3	33 \pm 4	31 \pm 2	28 \pm 4
HIV	9 \pm 2	7 \pm 2	8 \pm 2	7 \pm 4	6 \pm 2	9 \pm 2	7 \pm 2	5 \pm 2	7 \pm 3	8 \pm 2

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit 20 μ g/ml Peptid (P4wt bzw. den davon abgeleiteten alaninsubstituierten Varianten Ala213 – Ala226) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen nach Antigenkontakt im Zytokin-Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 Replikaten. (Reduktion der Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen ≥ 50 %: Fettdruck, grau unterlegt). Als unspezifisches Kontrollpeptid wurde ein HIV-Peptid verwendet. Spender, bei denen die reduzierte Immunogenität der P4wt-Varianten P4/M1, P4/M5 und P4/M6 charakterisiert wurde sind rot markiert.

3.3.7 Charakterisierung der MHC Klasse II-Restriktion der Epitope P1wt und P4wt

Aufgrund der unklaren Resultat bezüglich der HLA-Restriktion überprüften wir für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv nochmals, im Kontext welcher HLA-Genotypen (HLA-DR, HLA-DP oder HLA-DQ) die Präsentation der Epitope P1wt und P4wt erfolgt (Tab. 3-10).

In Inhibitionsversuchen wurden PBL-Fraktionen eingesetzt, in denen DP-, DQ- oder DR-Antigene mit Hilfe spezifischer Antikörper blockiert wurden. Die so präparierten PBL wurden im Standard-IFN- γ -Elispot eingesetzt.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen für beide Epitope P1wt und P4wt eindeutig, daß die Präsentation dieser Epitope über DR-Moleküle erfolgt. Lediglich unter Verwendung von anti-DR konnte die Zytokinsekretion spezifischer T-Helferzellen inhibiert werden.

Tabelle 3-10: Inhibition der P1wt- (A) und P4wt- (B) induzierten IFN- γ -Sekretion durch HLA-Genotyp-spezifische Antikörper*

A	anti-DR	anti-DP	anti-DQ	Kontroll-Antikörper
Spender				
2	5 \pm 2	25 \pm 3	30 \pm 4	28 \pm 2
5	7 \pm 2	19 \pm 2	24 \pm 2	21 \pm 3
9	3 \pm 1	26 \pm 3	30 \pm 3	31 \pm 3
10	6 \pm 2	21 \pm 3	28 \pm 3	27 \pm 3
19	4 \pm 1	20 \pm 2	25 \pm 2	22 \pm 2
23	8 \pm 3	21 \pm 2	24 \pm 3	27 \pm 2
26	5 \pm 2	22 \pm 2	30 \pm 3	31 \pm 3
27	6 \pm 3	37 \pm 3	42 \pm 2	44 \pm 2
29	6 \pm 2	29 \pm 2	33 \pm 2	29 \pm 1
30	4 \pm 1	22 \pm 2	29 \pm 2	26 \pm 3

B	anti-DR	anti-DP	anti-DQ	Kontroll-Antikörper
Spender				
2	8 ± 2	31 ± 3	37 ± 4	35 ± 4
7	4 ± 0	19 ± 2	24 ± 3	20 ± 3
10	5 ± 2	22 ± 2	33 ± 3	31 ± 3
13	3 ± 1	27 ± 2	29 ± 3	25 ± 2
16	5 ± 2	18 ± 1	26 ± 2	30 ± 3
17	7 ± 1	24 ± 2	23 ± 3	27 ± 2
19	7 ± 2	30 ± 3	33 ± 4	31 ± 2
26	4 ± 1	36 ± 4	42 ± 4	39 ± 4
27	8 ± 1	25 ± 2	31 ± 3	26 ± 4
30	3 ± 0	25 ± 2	28 ± 3	20 ± 2

* 1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit 20 µg/ml Peptid (P1wt bzw. P4wt) stimuliert und die Zahl reaktiver Zellen im Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Die Zahlen geben die Frequenz spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen pro 1×10^6 PBL wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 Replikaten. Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Kontrollantikörper wurde ein gegen MHC Klasse-Moleküle gerichteter Antikörper verwendet (W6/32). Signifikant geringere Zahlen IFN- γ -sezernierender Zellen nach HLA-Blockierung sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Für die in der Literatur beschriebenen Epitope P1wt und P4wt existieren keine eindeutigen Daten bezüglich ihrer MHC Klasse II-Restriktion. Während Celis und Mitarbeiter für das Epitop P1wt eine Präsentation über das DPw4-Allel postulierten, zeigten Honorati und Mitarbeiter daß dieses Epitop durch unterschiedliche HLA-Allele (DR2, DR11 und DR14) präsentiert werden kann (Celis *et al.*, 1988; Honorati *et al.*, 1997). Diese Arbeitsgruppe beschrieb zudem erstmals P4wt als immunogenes Epitop innerhalb des HBsAg und dessen Präsentation über die Moleküle DR7, DR8 und DR14.

Ein Vergleich der HLA-DR-Genotypen unseres Spenderkollektivs zeigt bei einem Vergleich mit den von Honorati und Mitarbeiter für P1wt und P4wt postulierten restriktiven DR-Allelen jedoch nur eine teilweise Übereinstimmung (Tab. 3-11). Sieben der 10 Spender mit T-Zell-Reaktivität gegen das Epitop P1wt tragen eines der restriktiven Allele DR2, 11 oder 14; lediglich 5 der Spender mit positiven T-Zellantwort gegen das P4wt –Epitop weisen eines der für die postulierte P4-Präsentation verantwortlichen DR-Allele DR7, 8 oder 14 auf.

Tabelle 3-11: HLA-DR-Haplotypen der P1wt und P4wt-reaktiven Spender*

Spender	HLA-DR Genotyp	T-Zellreaktion induziert durch Varianten P1/M7, P1/M11, P1/M12
2	DR 3, 16 (2); DR 51, 52	+
5	DR 1, 11 ; DR 51, 52	+
9	DR 1, 13 (14)	-
10	DR 15 (2), 3; DR 51, 52	+
19	DR 11 (5), 7; DR 52, 53	+
23	n. d.	+
26	DR 4, 11 ; DR 52, 53	-
27	DR 11 (5), 15 (2); DR 51, 52	-
29	DR 7, 11 ; DR 52	-
30	DR 2 , 11 ; DR 51, 52	-
Spender	HLA-DR Genotyp	T-Zellreaktion induziert durch Varianten P4/M1, P4/M5, P4/M6
2	DR 3, 16 (2); DR 51,52	-
7	DR 3, 7 ; DR 52	-
10	DR 15 (2), 3; DR 51,52	-
13	DR 1, 7 ; DR 53	+
16	DR 11, 8 ; DR 52	+
17	DR 7 , 11; DR 52, 53	+
19	DR 11 (5), 7 ; DR 52,53	+
26	DR 4, 11; DR 52, 53	-
27	DR 11 (5), 15 (2); DR 51, 52	+
30	DR 2, 11; DR 51, 52	+

*Die HLA-DR-Allele, in deren Kontext Honorati *et al.* zufolge die Präsentation der Epitope P1wt und P4wt erfolgt sind in der Tabelle rot markiert.

+: kein Unterschied in der Immunogenität der Varianten im Vergleich zu P1wt bzw. P4wt; -: reduzierte Immunogenität der Varianten im Vergleich zu P1wt bzw. P4wt; n. d. HLA-Genotyp nicht bekannt.

3.3.8 Einfluß der T-Helferzellen auf die *in vitro* anti-HBs-Produktion

Unsere Daten zeigen, daß durch einzelne Aminosäureaustausche innerhalb immunodominanter T-Helferzell-Epitope deren Immunogenität entscheidend verändert werden kann und in der Folge auch die Effektorfunktion HBsAg-spezifischer T-Zellen (T-Zellproliferation, Zytokinsekretion). Es stellt sich die Frage, inwieweit diese fehlende T-Zell-Hilfe Auswirkungen auf die anti-HBs-Produktion spezifischer B-Zellen *in vitro* hat.

In den nachfolgenden Versuchen sollte der Einfluß einer fehlenden T-Zellhilfe auf die anti-HBs-Produktion spezifischer B-Zellen *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden anti-HBs IgG-produzierende B-Zellen in einem modifizierten Elispot detektiert (siehe 2.2.3.2). Die Problematik hierbei war die extrem geringe Frequenz HBsAg-spezifischer B-Zellen im peripheren Blut immunisierter Personen. Trotz Verwendung des sensitiven Elispotsystems konnten bei den untersuchten Spendern nur Frequenzen von etwa 10 spezifischen B-Zellen/ 10^6 PBL gefunden werden. Diese geringen Frequenzen erlauben für die einzelnen Epitop-Varianten keine zuverlässigen Aussagen hinsichtlich ihrer stimulatorischen Kapazität.

Für die Versuche wurden daher PBL von Probanden verwendet, die unmittelbar vorher eine Auffrischimpfung erhalten hatten. Über einen Zeitraum von 2 Wochen nach der Impfung waren im peripheren Blut dieser Spender eine relativ hohe Zahl spezifischer B-Zellen nachzuweisen, was die Durchführung der geplanten Versuche ermöglichte.

In Vorversuchen wurde gezeigt, daß keine spontane anti-HBs-Produktion auftritt, d. h. die Induktion Antikörper-sezernierenden B-Zellen erfolgt nur in Anwesenheit entsprechender T-Helferzellen.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen bestätigten die Hypothese, daß eine spezifische B-Zellantwort nur mittels entsprechender T-Zellhilfe möglich ist (Abb. 3-16).

Während bei Verwendung von PBL von Spender 2 alle getesteten P1-Varianten eine vergleichbare anti-HBs-Produktion *in vitro* induzieren konnten, war im Fall von Spender 30 mit den Varianten P1/M7, P1/M11 und P1/M12 die Zahl anti-HBs-

sezernierender B-Zellen drastisch reduziert. Ein vergleichbares Bild lieferte die Stimulation von PBL des Spenders 2 mit den P4wt-Varianten. Stimulation der PBL mit P4/M1, P4/M5 und P4/M6 induzierte keine signifikante B-Zell-Antwort.

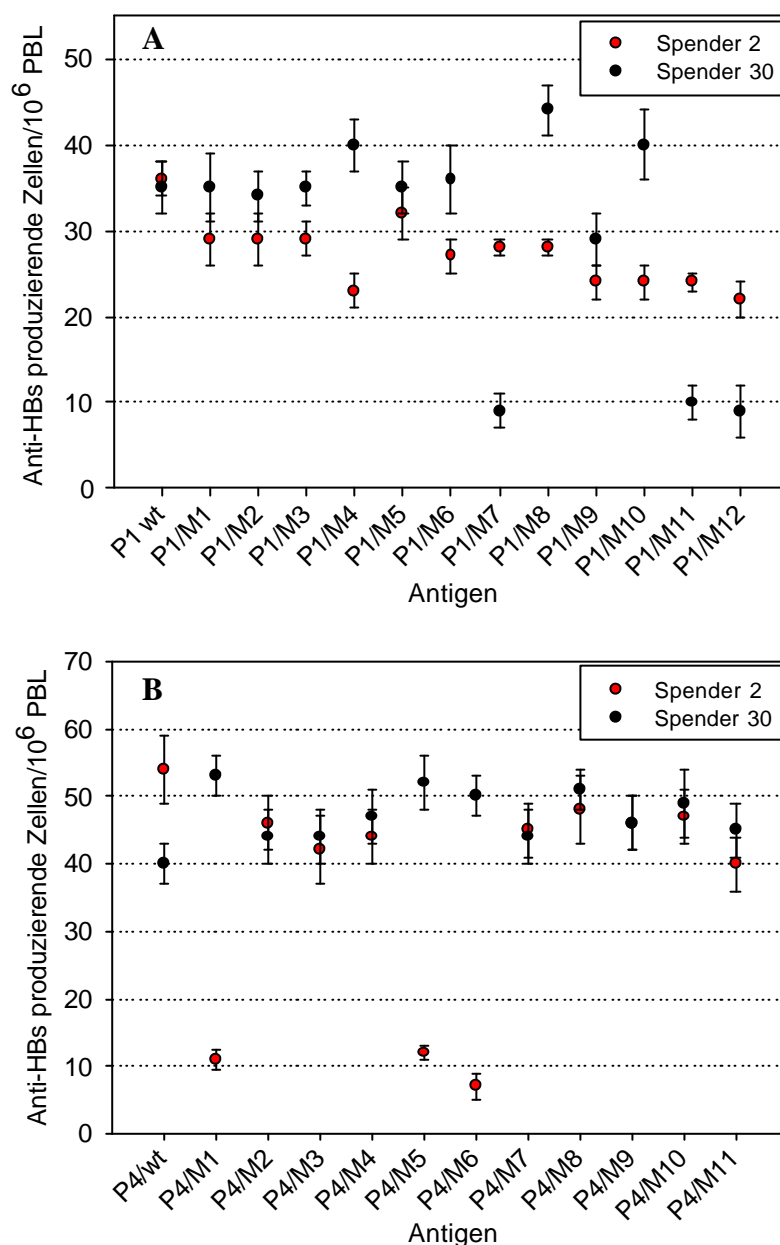


Abbildung 3-16: *In vitro*-Induktion anti-HBs-produzierender B-Zellen durch T-Helferzellen nach Stimulation mit P1wt (A) bzw. P4wt (B) und den davon abgeleiteten Varianten.

1×10^5 PBL/Ansatz wurden mit $20 \mu\text{g/ml}$ Peptid stimuliert (A: P1wt oder davon abgeleiteten Varianten [P1/M1-P1/M12]; B: P4wt oder davon abgeleiteten Varianten [P4/M1-P4/M11]) und die Zahl induzierter antikörpersezernierender B-Zellen im anti-HBs-Elispot ermittelt (siehe 2.2.3.2). Gezeigt ist die Frequenz anti-HBs-produzierender B-Zellen pro 1×10^6 PBL als Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen, wobei jeder in 5fach Ansätzen durchgeführt wurde.

3.3.9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß natürlich vorkommende Varianten der beiden immundominanten Epitope P1wt und P4wt T-Helferzellen bestimmter geimpfter Personen nicht stimulieren können.

Je drei der von P1wt- bzw. P4wt-abgeleiteten Varianten führten 4 von 10 Spendern zu einem Ausfall der Effektorfunktion HBsAg-spezifischer T-Helferzellen (T-Zellproliferation und Zytokinsekretion). Überraschend dabei war die Tatsache, daß lediglich ein Teil der Spender diesen Verlust der T-Zellreaktivität zeigten.

Die Charakterisierung der Varianten mit veränderter stimulatorischer Kapazität ergab, daß HBsAg-spezifische PBL der nicht-reaktiven Spender auf Aminosäuresubstitutionen an bestimmten Positionen innerhalb der beiden Epitope weit sensibler reagieren, als ein Großteil der Spender. Bei der beschriebenen Reaktion handelt es sich dabei um keinen dosisabhängigen Effekt. Die Überprüfung der HLA-Restriktion von P1wt und P4wt ergab, daß beide Epitope über DR-Allele präsentiert werden. Eine Zuordnung zu spezifischen MHC-Genotypen war dabei nicht eindeutig möglich. Durch die fehlende Aktivierung HBsAg-spezifischer T-Helferzellen, war auch die Induktion der Antikörperproduktion durch spezifischer B-Zellen beeinflußt.

4. Diskussion

Für die Wirksamkeit einer Vakzine ist die Kombination aus zellulären und humoralen Komponenten der Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Durch die antigene Komponente der Hepatitis B-Vakzine -das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg)- erfolgt die Induktion einer protektiven humoralen Immunantwort in Form neutralisierender Antikörper (anti-HBs). Die hier vorliegende Arbeit charakterisiert die zelluläre Immunantwort nach Hepatitis B-Impfung, speziell die Auswirkungen natürlich auftretender Varianten des Hepatitis B-Oberflächenantigens (HBsAg) auf die Wirksamkeit der Vakzine-induzierten Immunabwehr.

Die Aktivierung HBsAg-spezifischer CD4⁺-T-Helferzellen ist essentiell für die Stimulation von spezifischen B-Zellen und damit für die anti-HBs-Produktion. Trotz umfangreicher Studien bezüglich der Immunogenität der rekombinanten Hepatitis B-Vakzine wurde der Einfluß von natürlich auftretenden Epitop-Varianten der T-Zell-vermittelten Immunantwort bislang nicht untersucht.

4.1 Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Hepatitis B-Impfung

Die Charakterisierung der HBsAg-spezifischen zellulären Immunantwort erfolgte bis *dato* großteils durch Verwendung von T-Zelllinien und T-Zellklonen, die über mehrere Wochen unter Zugabe zusätzlicher Stimulatoren (z. B. IL-2, PHA) *in vitro* generiert wurden (Celis *et al.*, 1988; Min *et al.*, 1996; Honorati *et al.*, 1997). Nach neueren Erkenntnissen liefern derartige Langzeit-Zellkulturen ein verfälschtes Bild des tatsächlichen *in vivo*-Zustandes (Böcher *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die HBsAg-spezifische T-Zellantwort durch die Verwendung peripherer Blutlymphozyten (PBL) *ex vivo* und unter Vermeidung zusätzlicher Stimulatoren bestimmt.

In einem ersten Schritt wurde die antigenspezifische T-Zell-Proliferation untersucht. Der dafür verwendete Proliferationsassay erfordert eine vergleichsweise kurze

Kultivierung der Zellen (5 Tage) und gilt als Maß für die vorhandene CD4⁺-T-Zellimmunität.

Für 93 % der untersuchten Spender konnte dabei eine Reaktivität gegen das Gesamt-Antigen (HBsAg) gemessen werden, die in ihrer Intensität deutliche Unterschiede aufwies. Die Charakterisierung einzelner immunogener Bereiche innerhalb des HBsAg basierte zunächst auf bislang beschriebenen T-Helferzell-Epitopen, die in Form synthetischer Peptide zur Stimulation von PBL verwendet wurden. Bei lediglich 50 % der Spender war eine spezifische T-Zellreaktivität auf eines der vier Peptide detektierbar. Epitop P2wt (7 % aller Spender) und P3wt (17 %) erwiesen sich dabei als subdominante Epitope gegenüber P1wt und P4wt (beide je 33 %). Diese Immunodominanz/-subdominanz der einzelnen Epitope innerhalb unseres Kollektivs korreliert exakt mit Daten von Honorati und Mitarbeitern (Honorati *et al.*, 1997). Bezüglich der Intensität der proliferativen T-Zellantwort ist aufgrund der unterschiedlichen Ausgangs-Zellpopulationen (T-Zelllinien vs. PBL) ein Vergleich nur bedingt möglich.

Die exakte Quantifizierung spezifischer T-Zellen wurde bislang durch das Fehlen einfacher und zugleich sensitiver Testmethoden erschwert. Arbeiten von Scheibenbogen und Mitarbeitern, die erstmals die Identifizierung antigenspezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen mit Hilfe des Elispot zeigten, gaben Anlaß, diese Methode zum Nachweis CD4⁺-HBsAg-spezifischer T-Helferzellen (wiederum unter Verwendung von PBL *ex vivo*) zu etablieren (Scheibenbogen *et al.*, 1997).

Die ermittelten Frequenzen HBsAg-spezifischer T-Zellen bestätigen die Sensitivität des Elispot. Verglichen mit den bekannten Daten zeigt sich, daß die Zahl zirkulierender reaktiver T-Helferzellen im peripheren Blut HBV-geimpfter Spender weitaus höher ist als bislang angenommen. Für das Gesamt-HBsAg konnten wir im Mittelwert eine Frequenz von 1/29000 spezifischen T-Zellen ermitteln. Im Gegensatz zu vergleichbaren Publikationen ist dies eine um den Faktor zwei höhere Frequenz HBsAg-spezifischer T-Zellen (Degrassi *et al.*, 1992; Honorati *et al.*, 1997).

Nach den vorliegenden Ergebnissen wird durch die aktive HBV-Immunisierung bei einem Großteil aller Probanden eine relativ starke zelluläre Immunantwort induziert.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen Intensität der Immunantwort und zeitlichem Abstand zur Grundimmunisierung, d.h. auch bei Probanden mit länger zurückliegender Immunisierung konnten reaktive HBsAg-spezifische T-Helferzellen detektiert werden. Unsere Experimente ergaben, im Widerspruch zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, keine Korrelation zwischen zellulärer und humoraler HBsAg-spezifischer Immunantwort (Min *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 2000). Fraglich bleibt, aus welchem Grund bei zwei der Probanden trotz signifikanter Antikörpertiter keine reaktiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Frequenz HBsAg-spezifischer T-Zellen selbst für die sensitive Methode des Elispot zu gering war. Ein Antigendosis-abhängiger Effekt kann als Ursache jedoch ausgeschlossen werden.

Offen bleibt ebenso die Frage, wieso 50 % der Spender keine signifikante T-Zellantwort auf eines der Peptide zeigten. Denkbar wäre, daß auch in diesem Fall die Zahl der im peripheren Blut befindlichen HBsAg-spezifischen T-Zellen zu gering ist, um diese nachzuweisen. Unter Berücksichtigung der für das Gesamt-HBsAg gezeigten Elispot-Daten kann diese Vermutung nahezu ausgeschlossen werden. Von den betroffenen 15 Spendern zeigten 13 eine effektive T-Zellantwort gegen das Gesamtantigen. Aus diesen Befunden mußte vielmehr gefolgert werden, daß neben den bislang identifizierten vier T-Zell-Epitopen, innerhalb des HBsAg weitere immunogene Abschnitte existieren, die im Kontext mit MHC Klasse II-Molekülen spezifische CD4⁺-T-Zellen aktivieren (siehe 4.2).

Ein weiterer Parameter, die Art der reaktiven T-Zellsubpopulation, wurde durch Bestimmung des Zytokinprofils der im Elispot reaktiven T-Helferzellen ermittelt. Anhand der unterschiedlichen Zytokinprofile der beiden T-Helferzell-Subpopulationen Th1 und Th2 erfolgte parallel zur Quantifizierung auch die Charakterisierung der reaktiven T-Zellen.

Insbesondere hierzu existieren bislang äußerst kontroverse Daten. Dies liegt größtenteils an der Verwendung von nur bedingt untereinander vergleichbaren Testsystemen (Elisa, Elispot, intrazelluläre Zytokinbestimmung). Zudem erfolgten diese Analysen unter nicht vergleichbaren Ausgangsbedingungen (PBL vs. T-

Zelllinien) bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten (z. B. nach erster bzw. zweiter Impfung).

Studien, in denen HBsAg-spezifische T-Zelllinien und -Klone untersucht wurden, ergaben demnach ein Th0/Th2-Zytokinprofil (Tsutsui *et al.*, 1991; Honorati *et al.*, 1997). Th0-Zellen repräsentieren dabei Vorläuferzellen spezifischer T-Zellen, die im Laufe ihrer Entwicklung sowohl zu Th1- als auch zu Th2-Zellen differenzieren können (Sad *et al.*, 1994). Andere Arbeitsgruppen hingegen zeigen nach einer HBV-Grundimmunisierung eine eindeutig Th1-dominierte Reaktion HBsAg-spezifischer T-Zellen (Vingerhoets *et al.*, 1994; Böcher *et al.*, 1999).

Arbeiten, die zeigen, daß die Induktion der unterschiedlichen T-Zellpopulationen weniger antigen- als vielmehr spenderspezifisch ist (Larsen *et al.*, 2000), können durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Larsen und Mitarbeiter führen die Diskrepanz der verfügbaren Daten zudem auf mangelnde Sensitivität einiger Zytokin-Testsysteme (speziell für IL-4) zurück. Auch diese Hypothese kann durch unsere Daten nicht verifiziert werden, da die im einzelnen verwendeten Zytokin-Elispots in einer Reihe von Vorversuchen auf ihre Sensitivität überprüft und optimiert wurden.

Unsere eigenen Arbeiten ergaben, daß nach abgeschlossener Grundimmunisierung eine Th1-dominierte zelluläre Immunantwort vorliegt.

Ein weiterer, bis *dato* strittiger Punkt ist, ob durch die rekombinante Hepatitis B-Vakzine HBsAg-spezifische zytotoxischen T-Zellen induziert werden. Aufgrund der Zusammensetzung der Hepatitis-B-Vakzine ist eine CTL-Antwort im Grunde nicht zu erwarten. Jedoch wurde von Rahman und Mitarbeitern die Existenz von HBsAg-spezifischen CTL gezeigt (Rahman *et al.*, 2000).

Die Induktion einer CTL-Antwort erfordert etwa 50–100 Peptide in Kombination mit MHC Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. Im Fall von polyvalenten Antigenen, wie z. B. der 22 nm-Partikel der HBV-Vakzine, die mehrere hundert Kopien des Antigens auf ihrer Oberfläche tragen, würde demnach bereits die Aufnahme eines Partikels ausreichend sein, um eine effiziente CTL-Antwort zu induzieren.

Experimente, in denen die stimulatorische Kapazität von bekannten CTL-Peptiden untersucht wurde, lieferten für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv keinen Hinweis auf das Vorhandensein HBsAg-spezifischer CTL. In Inhibitionsversuchen konnte zudem gezeigt werden, daß es sich bei der impfinduzierten zellulären Immunantwort ausschließlich um eine MHC Klasse II-restringierte Immunantwort CD4⁺-T-Zellen handelt.

Das Fehlen einer CTL-Antwort wird auf das Adjuvans der bestehenden HBV-Vakzine, Aluminiumhydroxid (kurz: Alum), zurückgeführt. Generell kann durch Adjuvanzen der Antigenprozessierungs und -präsentationsweg beeinflußt werden (Schirmbeck *et al.*, 1994). In einer Studie von Rahman und Mitarbeitern wurde gezeigt, daß auch durch die Alum-HBV-Vakzine eine zytotoxische T-Zellantwort induziert werden kann. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Immunisierungsrouten, intramuskulär (i.m.) vs. intradermal (i.d.), bezüglich der Induktion von HBsAg-spezifischen CTLs verglichen (Rahman *et al.*, 2000). Den Daten zufolge wurde bei beiden Immunisierungsrouten *in vivo* eine signifikante, jedoch transiente CTL-Antwort gegen unterschiedliche HLA-A2-restringierte Epitope induziert. Die Antigen-Prozessierung und anschließende Präsentation im Kontext mit MHC Klasse I-Molekülen wird der Studie nach durch unreife dendritische Zellen, wie etwa den intradermal lokalisierten Langerhans-Zellen vermittelt (Steinman, 1993; Bachmann *et al.*, 1996).

Kritisch betrachtet bleiben bezüglich dieser Studie einige offene Fragen. So ist demnach unklar, auf welche Weise CTL bei den i.m. immunisierten Spendern induziert werden. Zudem wurde ein relativ kleines Kollektiv untersucht (i.d. n = 7; i.m. n = 4) und CTLs unter Verwendung von Peptidpools getestet, was eigenen Erfahrungen zufolge zu unspezifischen Reaktionen führen kann.

4.2 Vorhersage von T-Zell-Epitopen aufgrund bekannter Bindungsmotive

Versuche mit synthetischen Peptiden, die die komplette Sequenz des HBsAg abdecken, ergaben für unser Kollektiv keine eindeutigen Hinweise auf zusätzliche immunogene Bereiche. Eine Abweichung zwischen synthetischen Peptiden und den *in*

vivo prozessierten und präsentierten Peptiden kann jedoch bei diesen Versuchen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit, potentielle immunogene Bereiche innerhalb eines Antigens zu charakterisieren, ist die Verwendung von computergestützten Vorhersageprogrammen.

Im Gegensatz zu anderen peptidbindenden Proteinen ist bei MHC-Molekülen das Peptid integraler Bestandteil der Struktur, d.h. ohne seinen zugehörigen Peptidliganden ist das MHC-Molekül instabil. Dies ermöglicht die biochemische Isolierung und Charakterisierung von MHC-Molekülen zusammen mit ihren gebundenen Liganden aus entsprechenden antigenpräsentierenden Zellen. Bei der anschließenden Reinigung werden die Peptide durch Denaturierung der MHC-Peptid-Komplexe aus diesen eluiert, gereinigt und sequenziert (Rammensee, 1995). Zusätzlich kann mittels Röntgenstrukturanalyse auch der Komplex aus MHC-Molekül und Peptid untersucht werden (Brown *et al.*, 1993; Stern und Wiley, 1994; Stern *et al.*, 1994).

Die Kombination aus Sequenzanalysen natürlicher Peptidliganden und der Strukturanalyse von MHC-Peptid-Komplexen ergibt ein genaues Bild der an der Bindung beteiligten Komponenten. MHC Klasse II-Liganden weisen eine variable Länge von mindestens 13 Aminosäuren auf, wobei keine Längenbegrenzung, wie im Fall von MHC Klasse I-Liganden vorliegt (Rudensky *et al.*, 1991; Kropshofer *et al.*, 1993; Falk *et al.*, 1994). Das Peptid liegt in ausgestreckter Form in der MHC II-Bindungsfurche, wobei die Enden des Peptids nicht fest gebunden sind und somit über den Spalt hinausragen. Über sogenannte Verankerungs-Aminosäuren erfolgt die allelspezifische Bindung innerhalb des entsprechenden HLA-Moleküls. Jedes HLA-Allel ist gekennzeichnet durch ein bevorzugtes, individuelles Peptidmotiv, das durch essentielle Aminosäuren sowie Präferenzen bezüglich flankierender Aminosäuren definiert ist (Rammensee, 1996).

Im Vergleich zu MHC Klasse I-Molekülen sind bislang nur wenig Kristallstrukturen MHC Klasse II-gebundener Peptide bekannt. Zu den derzeit bestens charakterisierten Molekülen zählen die allelen Formen der HLA-DR-Genprodukte (Rammensee, 1995). Eine seit kurzem zugängliche Datenbank (*ProPred. MHC Class-II binding peptide prediction server*; <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>) ermöglicht die Vorhersage von Bindungsliganden von 51 unterschiedlichen HLA-Allelen. Dies entspricht etwa 90 % der *in vivo* exprimierten HLA-DR-Genprodukte (Singh *et al.*, 2001). Die Analyse stützt sich dabei auf essentielle Verankerungsreste, die mit Hilfe synthetischer kombinatorischer Peptidbibliotheken für einzelne HLA-Allele charakterisiert wurden (Sturiniolo *et al.*, 1999).

Anhand dieser Datenbank wurde für das HBsAg die Vorhersage potentieller MHC Klasse II-restringierter Epitope mittels Sequenzhomologien zu bekannten Peptid-Bindungsmotiven durchgeführt. Dieser Analyse zufolge befinden sich –zusätzlich zu den bereits beschriebenen– in zwei Bereichen innerhalb des HBsAg (Aminosäureposition 70– 80 und 170– 190) potentielle MHC Klasse II-restringierte T-Zell-Epitope. Dies konnte jedoch in den Versuchen mit überlappenden Peptiden trotz Übereinstimmung des HLA-Genotyps der getesteten Spender mit dem prognostizierten restriktiven HLA-Allel nicht bestätigt werden. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen Epitopvorhersage und Experimentalbefunden ergab auch eine weitere Studie innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Die vorhergesagte Immunogenität einzelner MHC Klasse I-restringierter CTL-Epitope des Epstein-Barr-Virus konnte in entsprechenden Experimenten nicht bestätigt werden (Benninger-Döring, 1999).

4.3 Rolle der Th1-Zytokine bei der Infektion humaner Hepatozyten

Wie gezeigt wird die zelluläre Immunantwort nach HBV-Impfung über die Th1-Population der Lymphozyten vermittelt. Charakteristisch für diese Subpopulation der T-Helferzellen ist die Sekretion von IFN- γ und TNF- α . Für uns stellte sich die Frage, welche Rolle diese Zytokine in der T-Zell-vermittelten Immunantwort spielen.

In Versuchen mit transgenen Mäusen wurde der Einfluß von Zytokinen auf die Replikation des Hepatitis B-Virus *in vitro* bereits eingehend untersucht (Schultz *et al.*,

1999; McClay *et al.*, 2000). Bislang ging man davon aus, daß diese Zytokine im Verlauf der natürlichen Infektion ausschließlich von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen sezerniert werden. Unterstützt wurde diese Vermutung dadurch, daß humane Hepatozyten keine MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen und somit keine $CD4^+$ -restringierte Antigenpräsentation erfolgen kann. Mittlerweile ist bekannt, daß durch $IFN-\gamma$ die Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf humanen Hepatozyten induziert wird (Chiu *et al.*, 1997). Zudem kann die MHC Klasse II-restringierte Antigenpräsentation über nicht-parenchymale Zellen der Leber wie etwa den Kupfer-Zellen erfolgen. Tatsächlich sind auch infiltrierende $CD4^+$ -T-Lymphozyten in der Leber nachweisbar (Bertoletti *et al.*, 1997).

Neueren Erkenntnissen zufolge spielen speziell $CD4^+$ -T-Helferzellen eine weitaus wichtigere Rolle für die HBV-Infektion als bislang angenommen. Es wird vermutet, daß sie in der Lage sind, im Verlauf einer HBV-Infektion die virale Replikation zu inhibieren und somit entscheidend in den Infektionsverlauf einzugreifen (Franco *et al.*, 1997). Speziell die bereits sehr früh in der präklinischen Phase der Infektion auftretenden HBsAg-spezifische $CD4^+$ -T-Helferzellen (Chisari, 1997) könnten dabei eine wichtige Rolle spielen.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde ein Modellsystem entwickelt, das die *in vitro* HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten ermöglicht. Anhand dieses Infektionsmodells konnte der Einfluß der Th1-Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ auf den Verlauf und die Effizienz einer HBV-Infektion charakterisiert werden. Da aufgrund der MHC-Restriktion der Hepatozytenkultur die Zugabe von HBsAg-spezifischen T-Helferzellen nicht direkt durchführbar war, wurde der unmittelbare Einfluß von $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ auf die infizierten Leberzellen untersucht.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigten erstmals am Beispiel humaner Hepatozyten die replikationshemmende Wirkung dieser Zytokine und stärken damit die genannten Hypothesen. Neben der erwartungsgemäßen Dosisabhängigkeit dieses Effektes ergaben die Versuche auch, daß der Zeitpunkt von dem an die Zytokinsekretion erfolgt, von entscheidender Bedeutung ist. Lediglich durch eine sehr

frühe Zugabe von IFN- γ und TNF- α konnte der beschriebene Effekt induziert werden. Obgleich es sich bei diesem Infektionsmodell um ein zugegebenermaßen artifizielles System handelt, erlaubt es dennoch erstmals Untersuchungen an humanen Hepatozyten und repräsentiert somit das dem *in vivo* Zustand am nächsten liegende Modell.

4.4 Reaktivität spezifischer T-Helferzellen gegenüber Varianten des HBsAg

Die Beziehung zwischen Virus und Wirt spiegelt einen dynamischen Prozeß wieder, der unter anderem durch die Variabilität des Virus beeinflusst wird. Im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion unterliegen die Anzahl und die Verteilung von Mutationen innerhalb des HBV-Genoms einem ständigen Wandel und führt dadurch zur Entstehung neuer Quasispezies. Eine Erklärung hierfür ist sicher die, verglichen mit anderen DNA-Viren, 4fach höhere Mutationsrate von HBV (Brunetto *et al.*, 1999).

Die Ursache hierfür liegt zum einen in der hohen viralen Replikationsrate, zum anderen in der hohen Fehlerrate des Schlüsselenzyms der HBV-Replikation, der Reversen Transkriptase. Dennoch ist, verglichen mit anderen Viren, die diesen Replikationsmechanismus verwenden (z. B. HIV), die Mutationsrate von HBV insgesamt betrachtet gering, da insbesondere durch die Anordnung des Virusgenoms in überlappenden Leserahmen viele der auftretenden Mutationen zu letalen Virusnachkommen führen und sich dadurch nicht im Wirtsorganismus manifestieren können (Girones *et al.*, 1989).

In den zurückliegenden 10 Jahren wurden zahlreiche Varianten des Hepatitis B-Virus mit strukturellen Veränderungen innerhalb des HBsAg beschrieben. Speziell dem Auftreten von sogenannten humoralen *escape*-Varianten wurde dabei größte Aufmerksamkeit geschenkt (Carman *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 1992; Ghany *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Cooreman *et al.*, 2001).

Bertoletti und Mitarbeiter zeigten schließlich erstmals, daß *immune-escape* auch auf zellulärer Ebene stattfinden kann (Bertoletti *et al.*, 1994a). Demnach führen einzelne Aminosäuresubstitutionen in einem immunodominanten CTL-Epitop des Hepatitis

core-Antigens (HBcAg) zu antagonistischen Peptiden und in der Folge durch ihre inhibitorische Wirkung auf die korrespondierenden CTL zum Status der T-Zell-Anergie (Bertoletti *et al.*, 1994b). Tai und Mitarbeiter zeigten nachfolgend, daß neben immunogenen Bereichen der humoralen Immunantwort ebenso Sequenzbereiche, die MHC Klasse I-restringierte CTL-Epitope repräsentieren, eine Vielzahl von Mutationen aufweisen (Tai *et al.*, 1997).

Für uns stellte sich die Frage, inwieweit spezifische Effektorfunktionen des durch die Impfung induzierten Repertoires an T-Zellen durch Veränderungen ihrer antigenen Zielstruktur beeinflußt werden.

4.4.1. Variabilität des Hepatitis B-Oberflächenantigens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Häufigkeit natürlich vorkommender Varianten innerhalb immunogener Bereiche des HBsAg bestimmt, die für die T-Helferzell-vermittelte Immunität verantwortlich sind. Durch einen Vergleich aller bis *dato* veröffentlichten HBsAg-Sequenzen konnte eine Reihe von natürlich vorkommenden Varianten der Epitope P1wt (n = 12) und P4wt (n = 11) identifiziert werden.

Aufgrund des bekannten antigenen Hintergrundes (HBsAg-Sequenz der Vakzine) bilden geimpfte Spender das ideale Kollektiv, um die Auswirkung einzelner Aminosäureaustausche innerhalb definierter Epitope auf die Reaktivität HBsAg-spezifischer T-Helferzellen zu untersuchen.

4.4.2. Einfluß von Aminosäureaustauschen innerhalb spezifischer T-Helferzell-Epitope auf deren stimulatorische Kapazität

Unsere Daten bestätigten die Vermutung, daß Mutationen in T-Helferzell-Epitopen deren stimulatorische Kapazität entscheidend verändern können. Neben der Reduktion der proliferativen T-Zellantwort beeinflussen diese Varianten auch eine zweite

Effektorfunktion der T-Zellen, die Ausschüttung von immunmodulatorischen Zytokinen.

Wie gezeigt wurde bei 40 % der untersuchten Spender die protektive zelluläre Immunantwort durch P1wt- bzw. P4wt-spezifische T-Zellen vermittelt. Sowohl für das Epitop P4wt als auch für P1wt konnten wir Epitop-Varianten charakterisieren, die nicht in der Lage sind, die Reaktivität HBsAg-spezifischer T-Helferzellen zu induzieren. Als Ursache konnte in Epitop P1wt ein Aminosäureaustausch an Position 21, in Epitop P4wt an Position 220 identifiziert werden. Die fehlende stimulatorische Kapazität der betreffenden Epitop-Varianten hatte den Verlust der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation sowie eine reduzierten Zytokinsekretion der HBsAg-spezifischen T-Zellen zur Folge.

Zudem hatte die fehlende T-Zell-Reaktivität auch Auswirkungen auf die humorale Immunantwort. Die Produktion von anti-HBs durch spezifische B-Zellen erfordert die Aktivierung der B-Zellen durch entsprechende T-Helferzellen. Durch den gezeigten Ausfall der Zytokinsekretion spezifischer T-Helferzellen fehlt ein essentielles co-stimulatorisches Signal dieses Prozesses. Die fehlende stimulatorische Kapazität der Varianten P1/M7, P1/M11, P1/M12 sowie P4/M1, P4/M5 und P4/M6 führte folglich bei den entsprechenden Spendern auch zu keiner Induktion der Antikörperproduktion *in vitro*.

Überraschenderweise zeigten nicht alle untersuchten Spender die gleiche Reaktion. Die fehlende stimulatorische Kapazität der Varianten P1/M7, P1/M11, P1/M12 sowie P4/M1, P4/M5 und P4/M6 wurde lediglich bei 4 von 10 Spendern beobachtet. Ein Vergleich der T-Zell-Reaktivität induziert durch das Ausgangs-Epitop P1wt bzw. P4wt bzw. eine der korrespondierenden Varianten lieferte bei den verbleibenden 6 Probanden keine signifikanten Unterschiede. Versuche mit alaninsubstituierten Peptiden unterstützten die These, daß das gezeigte Phänomen spenderspezifischen Kriterien unterliegt.

Die molekularen Grundlagen dieser spenderspezifischen Unterschiede sind bislang unklar, zumal ein vergleichbares Phänomen bislang nicht beschrieben wurde. Eine Reihe weiterführender Untersuchungen ist nötig, um diese Frage zu klären. Einige Hypothesen werden jedoch im folgenden erläutert.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Epitop-Varianten aufgrund des Aminosäureaustauschs nicht an das korrespondierende MHC-Molekül binden. Ebenso denkbar ist jedoch, daß die Präsentation unbeeinflusst bleibt, die Mutation aber essentielle Positionen der T-Zellrezeptor-Bindungsstellen betrifft. Demnach würde der MHC- Peptid-Komplex durch spezifische T-Zellen nicht erkannt.

Auszuschließen ist dagegen, daß die Mutation die Antigenprozessierung beeinflusst, d. h. die entsprechenden Epitop-Varianten *in vivo* nicht prozessiert werden. Da die Mehrheit der Spender auch auf die Varianten P1/M7, P1/M11, P1/M12 sowie P4/M1, P4/M5 und P4/M6 mit einer T-Zellaktivierung reagiert, müssen demzufolge auch die Peptide *in vitro* prozessiert werden. Da die Antigenprozessierung durch konservierte Proteasen erfolgt (Watts, 2001) ist auch eine spenderspezifische Prozessierung zudem unwahrscheinlich.

Eine offene Frage ist die HLA-Restriktion der beiden Epitope P1wt und P4wt. Wie unter 3.3.5 gezeigt kamen wir, ebenso wie andere Arbeitsgruppen, zu dem Schluß, daß die Präsentation der beiden Epitope über unterschiedliche HLA-Allele erfolgen muß. Dieser Befund wurde auch durch die Ergebnisse der Vorhersage-Programme bestätigt (siehe 4.2). Ein derartig breites Restriktionsspektrum bei T-Zell-Epitopen wurde erstmals im Zusammenhang mit einem Malaria-Antigen beobachtet (Sinigaglia *et al.*, 1988). Panina-Bordignon und Mitarbeiter konnten in der Folge die Existenz universeller, DR-restringierter T-Zell-Epitope zeigen, die sowohl über eine Vielzahl unterschiedlicher HLA-Allele präsentiert werden als auch innerhalb eines Spenders T-Zellen unterschiedlicher Spezifität induzieren (Panina-Bordignon *et al.*, 1989). Diese spenderspezifische Flexibilität der T-Zellantwort hat zur Folge, daß dasselbe Peptid durch T-Zellen von Spender 1 ausschließlich allelspezifisch (*monogamous T cell*

clones) im Fall von Spender 2 im Kontext mit diversen HLA-Allelen (*promiscuous T cell clones*) erkannt wird.

Möglicherweise handelt es sich bei P1wt und P4wt um derart universelle Epitope. Dies würde neben der Immundominanz dieser Epitope und der Oligospezifität der HBsAg-induzierten zellulären Immunantwort auch die kontroversen Daten bezüglich der HLA-Restriktion erklären. Es kann spekuliert werden, ob die möglicherweise universellen Epitope P1wt und P4wt sowie die davon abgeleiteten Varianten über eine Vielzahl von HLA-Allelen präsentiert werden können. Spender, deren T-Zellantwort durch ein breites Spezifitätsspektrum vermittelt wird, würden somit jede der MHC-Peptid-Kombinationen erkennen. Spender mit stringent allelspezifischen T-Zellen könnten Peptidvarianten im Kontext anderer MHC-Moleküle nicht erkennen, was zum Verlust der T-Zellreaktivität führt.

Das Hepatitis B-Virus hat im Lauf seiner Evolution zahlreiche Persistenz-Mechanismen entwickelt. Es ist durchaus denkbar, daß durch universelle Epitope induzierte T-Zellen mit einem breitem Spezifitätsspektrum dem Wirtsorganismus ermöglichen, der hohen antigenen Variabilität des Virus entgegenzuwirken.

4.5 Stellen T-Helferzell-Epitope mit veränderter Immunogenität eine Gefahr für die Wirksamkeit der HBV-Vakzine dar?

Die Aminosäureaustausche in den Epitop-Varianten P1/M7, P1/M11, P1/M12 sowie P4/M1, P4/M5 und P4/M6 führen zu einer scheinbar spenderspezifische Veränderung ihrer stimulatorischen Kapazität, die bei einigen der untersuchten Probanden zum Verlust der Reaktivität HBsAg-spezifischer T-Helferzellen führt.

Fraglich ist, inwieweit derartige Epitop-Varianten die Wirksamkeit der gegenwärtig verwendeten HBV-Vakzine in Frage stellen. Kann eine Infektion mit einer Variante des Hepatitis B-Virus, die eine der charakterisierten, kritischen Sequenzänderungen des HBsAg beinhaltet, zu einer Infektion führen?

Im Hinblick auf die betroffenen Probanden kann dies klar verneint werden. Bei jedem dieser Spender war eine signifikante humorale Immunantwort nachweisbar, die in Form von neutralisierenden Antikörpern den unmittelbaren Schutz vor einer Infektion bietet.

Eine potentielle Gefahr bestünde erst bei einem Absinken des Antikörpertiters unter den allgemein als protektiv angesehenen Wert von 10 IU/ml. Erfolgt nun eine Infektion mit einer HBV-Mutante, die Epitope mit veränderter stimulatorischer Kapazität beinhaltet, könnte die fehlende T-Helferzell-Reaktivität zu einer Manifestation der Infektion führen. Jedoch gibt es auch hier Einschränkungen. So wurden bei jedem der Spender reaktive T-Zellen gegen 2 der 4 bekannten Epitope nachgewiesen. Somit könnte der Ausfall eines Epitops vermutlich kompensiert werden.

Dennoch gilt es, die Häufigkeit derartiger HBsAg-Varianten und die Relevanz ihrer veränderten immunologischen Eigenschaften zu beobachten. Eine der wichtigsten Kernfrage hierzu ist, inwieweit die derzeit eingesetzte rekombinante HBV-Vakzine die Entwicklung derartiger Mutanten begünstigt und ob diese Mutanten eine reelle Gefahr für die bestehenden HBV-Impfprogramme darstellen. Können möglicherweise durch den natürlichen Selektionsdruck auch Varianten entstehen, die mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Prävalenz auftreten (Wilson *et al.*, 1999)?

Die Ausbreitung von Mutanten des Hepatitis B-Virus wurde anhand bestehender epidemiologischer Daten mit Hilfe mathematischer Modelle berechnet (Wilson *et al.*, 1998), wobei einige Punkte problematisch waren. Da die HBV-Vakzine erst seit relativ kurzer Zeit eingesetzt wird, ist der durch sie bislang vermittelte Selektionsdruck sicher zu gering, um die Evolution von HBV entscheidend zu beeinflussen.

Zudem sind die für derartige Berechnungen wichtigen Parameter bislang unzureichend charakterisiert, wie beispielsweise die Prävalenz und relative Infektiösität einzelner Mutanten, verglichen mit dem Wildtyp-Virus, oder aber die isolatübergreifende Wirksamkeit der bestehenden Vakzine.

Sicherlich ist die derzeit verwendete HBV-Vakzine sehr effektiv bezüglich ihrer Immunogenität und Sicherheit bei Infektionen mit dem Wildtyp-Virus. Ggesetzt den Fall, die bestehende Vakzine wäre völlig ineffizient in der Kontrolle einzelner HBV-Mutanten, so würde es etwa 50 Jahre dauern, bis sich eine Dominanz der Virusmutanten bezüglich der Wildtypform zeigen würde. Nicht zuletzt angesichts der weltweiten geplanten Ausdehnung der HBV-Impfprogramme, verbunden mit dem Ziel der Eradikation des Erregers, ist die Charakterisierung von HBsAg-Varianten, die zu veränderten immunologischen Eigenschaften führen, zwingend erforderlich.

Eine Ergänzung der HBV-Vakzine um zusätzliche immunogene Komponenten (z. B. PräS-Proteine) wird derzeit diskutiert. Über die Immunogenität derartiger Vakzine liegen allerdings bislang widersprüchliche Angaben vor (Jilg *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001).

5. Literatur

1. **Almeida JD**. Individual morphological variations seen in Australia antigen positive sera. *Am J Dis Child* 1972; 123: 303
2. **Alpini G**, Philips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 1994; 20: 494-514
3. **Andre FE**, Zuckerman AJ. Protective efficacy of hepatitis B vaccines in neonates. *J Med Virol* 1994; 44: 144-151
4. **Ashton RP**, Murray K. Mutations that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *J Med Virol* 1989; 29: 204-214
5. **Avantaggiati ML**, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, De Marzio E, Collepardo D, Levvero M. The hepatitis B Virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 1993; 8: 1567-1574
6. **Balsano C**, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levvero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivates the c-myc proto-oncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 985-992
7. **Bancroft WH**, Mundo FK, Russel PK. Detection of additional determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972; 109: 842-848
8. **Barnaba V**, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I restricted, exogenous antigen specific T lymphocytes. *Nature* 1990; 345: 258-260
9. **Barnaba V**, Franco A, Paroli M, Benvenuto R, Santilio I, Balsano F. T cell recognition of hepatitis B envelope proteins. *Arch Virol Suppl* 1992; 4: 19-22
10. **Bartenschlager R**, Schaller H. The amino terminal domain of the hepadnaviral P gene encodes the terminal protein (genome-linked-protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J* 1988; 7: 4185-4192
11. **Basaras M**, Santanaria A, Sarsa M, Gutierrez E, de Olano Y, Cisterna R. Seroprevalence of hepatitis B and C, and human immunodeficiency type 1 viruses in a rural population from the Republic of Equatorial Guinea. *Tras R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 250-252
12. **Bayer ME**, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* 1968; 218: 1057-1059
13. **Benn J**, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996; 70: 4978-4985
14. **Benninger-Döring G** Identifizierung und Charakterisierung der zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen *immediate early*-Antigene des Epstein-Barr-Virus, Dissertation, Universität Regensburg
15. **Bertoletti A**, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 113: 1050-1051
16. **Bertoletti A**, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levvero M, De Carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994a; 369: 407-410

17. **Bertoletti A**, Costanzo A, Chisari FV, Levrero M, Artini M, Sette A, Penna A, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med* 1994b; 180: 933-943
18. **Bitter GA**, Egan KM, Burnette WN, Samal B, Fieschko JC, Peterson DL, Downing MR, Wypych J, Langley KE. Hepatitis B vaccine produced in yeast. *J Med Virol* 1988; 25: 123-140
19. **Blumberg BS**, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-546
20. **Blumberg BS**, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Am Intern Med* 1967; 66:924-931
21. **Böcher WO**, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer zum Büschenfelde KH, Löhr HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology* 1999; 29: 238-244
22. **Bos P**, Steele AD, Peenze I, Aspinall S. Sero-prevalence to hepatitis B and C virus infections in refugees from Mozambique in southern Africa. *East Afr Med* 1995; 72: 113-115
23. **Bradley WH**. Homologous serum jaundice. *Proc R Soc Med* 1946; 39: 649-654
24. **Brown JH**, Jardetzky TS, Stern LJ, Wiley DC. 3-dimensional structure of the human class-II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39
25. **Brunetto MR**, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 1999; 42: 69-80
26. **Buynak EB**, Roehm RR, Tyrtell AA, Bertland AU, Lampson GP, Hilleman MR. Development and chimpanzee testing of a vaccine against human hepatitis B. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 151: 694-700
27. **Calvert J**, Summers J. Two regions of the avian hepadnavirus RNA pregenome are required in cis for encapsidation. *J Virol* 1994; 68: 2084-2090
28. **Carman W**, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329
29. **Carman W**, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet*; 1993; 341, 349-353
30. **Celis E**, Dawei O, Otvos L. Recognition of hepatitis B surface antigen by human T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 140: 1808-1815
31. **Chang HK**, Wang BY, Yuh CH, Wsei CL, Ting LP. A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5189-5197
32. **Chang LJ**, Ganem D, Varmus HE. Mechanism of translation of the hepadnaviral polymerase (P) gene. *PNAS* 1990; 87: 5158-5162
33. **Chang C**, Zhou S, Ganem D, Standring D. Phenotypic mixing between different hepadnaviral nucleocapsid subunits reveals that C protein dimerization is cis preferential. *J Virol* 1994; 68: 5225-5231
34. **Chang MH**, Chen DS. Prospects for hepatitis B virus eradication and control of hepatocellular carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 511-517
35. **Chang SF**, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Fröhlich K, Will H. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* 1999; 262: 39-54
36. **Chen H**, Kaneko S, Girones R, Anderson R, Hornbuckle W, Tennant B, Cote P, Gerin J, Purcell R, Miller R. The woodchuck hepatitis X gene is important for the establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993; 67: 1218-1226

37. **Cheong JH**, Yi MK, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eucaryotic nuclear RNA polymerases binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995; 14: 143-150
38. **Chiou HL**, Lee TS, Kuo J, Mau YC, Ho MS. Altered antigenicity of a-determinant variants of hepatitis B virus. *J Gen Virol* 1997; 78: 2639-2645
39. **Chiu J**, Lui W, Chang H, Loong C, Wu L, Kao H, Wu C. Class I and Class II major histocompatibility complex antigens expression on human hepatocytes and hepatoma cells : an approach with high sensitivity and specificity. *Cytometry* 1997; 30: 317-323
40. **Chirillo P**, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF- κ B dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996; 70: 641-646
41. **Chisari FV**, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RD. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *PNAS* 1987; 84: 6909-6913
42. **Chisari FV**, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
43. **Chisari FV**, Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G (Hrsg.). *Viral hepatitis and liver disease*. Torino; Edizioni Minerva Medica 1997: 405-415
44. **Chowdhury A**, Santra A, Chowdhury S, Gosh A, Banerjee P, Mazumder DN. Prevalence of hepatitis B infection in the general population: a rural community based study. *Trop Gastroenterol* 1999; 20: 75-77
45. **Courtois G**, Baumheuter S, Crabtree G. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters: *PNAS* 1988; 85: 7937-7641
46. **Collins DS**, Findlay K, Harding CV. Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens *in vivo* generates class I MHC-restricted T cell response. *J Immunol* 1992; 148: 3336-3341
47. **Cooreman M**, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B surface antigens. *J Biomed Sci* 2001; 8: 237-247
48. **Crowther RA**, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 1994; 77: 943-950
49. **Dane DS**, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; i: 695-698
50. **De Bruin W**, Leenders W, Kos T, Hertogs K, Depla E, Yap SH. Hepatitis delta virus attaches to human hepatocytes via liver endonexin II, a specific HBsAg binding protein. *J Viral Hepat* 1994; 1: 33-38
51. **Degrassi A**, Mariani E, Honorati MC, Faccini A. Cellular response and anti-HBs synthesis in vitro after vaccination with yeast derived recombinant hepatitis vaccine. *Vaccine* 1992; 10: 617-622
52. **Delort AM**, Duplaa AM, Molko D, Teoule R. Excision of uracil residues in DNA: mechanism of action of *Escherichia coli* and *Mircrococcus luteus* uracil-DNA glycosylases. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 319-335
53. **Douglas DD**, Taswell HF, Rakela J, Rabe D. Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibodies to hepatitis B core antigen positive from the United States population with a lower prevalence of hepatitis B serologic markers. *Transfusion* 1993; 33: 212-216
54. **Doria M**, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmatic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995; 15: 4747-4757

55. **Dusheiko G**. Hepatitis B: an overview. In: Rizetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G (Hrsg.). Viral hepatitis and liver disease. Torino; Edizioni Minerva Medica 1997: 57-66
56. **Falk K**, Röttschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing and general rules. Immunogenetics 1994; 39: 230-242
57. **Faruqi AF**, Reychoudhury S, Greenberg R, Israel J, Shih C. Replication-defective missense mutations within the terminal protein and spacer/intron regions of the polymerase gene of human hepatitis B virus. Virology 1991; 183: 764-786
58. **Feitelson MA**, Millman I, Blumberg BS. Tree squirrel hepatitis B virus: antigenic and structural characterization. PNAS 1986; 83: 2994-2997
59. **Feitelson MA**, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B X antigen and p53 are associated *in vitro* and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. Oncogene 1993; 8: 1109-1117
60. **Fernholz D**, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. Virology 1993; 194: 137-148
61. **Ferrari C**, Penna A, Sansoni P, Giuberti T, Neri TM, Chisari FV, Fiaccadori F. Selective sensitization of peripheral blood T lymphocytes to hepatitis B core antigen in patients with chronic active hepatitis type B. Clin Exp Immunol 1986; 66: 497-506
62. **Ferrari C**, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B infection. J Immunol 1990; 145: 3442-3449
63. **Findlay GM**, Martin NH, Mitchell JB. Hepatitis after yellow fever inoculation: relation to infective hepatitis. Immunology and epidemiology. Lancet 1944; 2: 365-370
64. **Fleckenstein B**, Jung G, Wiesmüller KH. Quantificative analysis of peptide-MHC class II interaction. Sem Immunol 1999; 11: 405-416
65. **Fox JP**, Manso C, Penna HA, Para M. Observation on occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever. Am J Hyg 1942; 36: 63-116
66. **Franco A**, Guidotti L, Hobbs MV, Pasquetto V, Chisari F. Pathogenetic effector function of CD4 positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. J Immunol 1997; 159: 2001-2008
67. **Fujii H**, Moriyama K, Sakamoto N, Kondo T, Yauda K, Hiraizumi Y, Yamazaki M, Sakaki Y, Okochi K, Nakajima E. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. Biochem Biophys Res Commun 1992; 184: 1152-1157
68. **Gallina A**, Gazina E, Milanese G. C-terminal preS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B L protein in 293 cells. Virology 1995; 213: 57-69
69. **Ganem D**. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. Rev Infect Dis 1982; 4: 1026-1047
70. **Gerin J**, Cote P, Korba B, Miller R, Purcell R, Tennant B. Hepatitis B virus and liver cancer: the woodchuck as an experimental model of hepadnavirus-induced liver cancer. In: Hollinger B, Lemon S, Margolis H (Hrsg.). Viral Hepatitis and liver disease. Baltimore; Williams and Wilkins 1991: 556-559
71. **Girones R**, Miller RH. Mutation rate of hepadnavirus genome. Virology 1989; 170: 595-597
72. **Grady GF**, Lee VA, Prince AM. Hepatitis B immune globulin for accidental exposure among medical personnel: Final report of a multicenter controlled trial. J Infect Dis 1978; 138: 625-638
73. **Grethe S**, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. J Virol 2000; 74: 5377-5381

-
74. **Guidotti LG**, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel RD, Schreiber RD, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *PNAS* 1994; 91: 3764-3768
 75. **Guidotti LG**, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-26
 76. **Harford N**, Cabezon T, Crabeel M, Simoen E, Rutgers A, De Wilde M. Expression of hepatitis B surface antigen in yeast. *Dev Biol Stand* 1983; 54: 125-130
 77. **Harrison TJ**, Oon CJ, Zuckerman AJ. A novel antibody escape variant (Ala 144) of hepatitis B virus in an identical twin before selection in the mother. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (Hrsg.). *Viral hepatitis and liver disease*. Tokio; Springer 1994: 248-251
 78. **Haviv I**, Vaizel D, Shaul Y. pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner. *EMBO J* 1996; 15: 1217-1226
 79. **Heermann KH**, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Bamgartner H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 1984; 52: 396-402
 80. **Heermann KH**, Gerlich WH, Chudy M, Schaefer S, Thomssen R. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 68-73
 81. **Hertogs K**, Leenders WP, Depla E, De Bruin WC, Meheus L, Raymackers J, Moshage H, Yap SH. Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* 1994; 197: 549-557
 82. **Hillemann MR**. Hepatitis B and AIDS and the promise for their control by vaccines. *Vaccine* 1988; 6: 175-179
 83. **Hino K**, Okuda M, Hashimoto O, Ishiko H, Okazaki M, Fujii K, Hanada H, Okita K. Glycine-to-arginine substitution at codon 145 of HBsAg in two infants born to hepatitis B e antigen-positive carrier. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 566-570
 84. **Hirsch R**, Lavine J, Chang L, Varmus H, Ganem D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 1990; 344: 552-555
 85. **Holland PM**, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 1991; 88: 7276-7280
 86. **Hollinger FB**. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Hrsg.). *Virology*. Philadelphia; Lippincott-Raven 1996; 2739-2807
 87. **Honigwachs J**, Faktor O, Dikstein R, Shaul Y, Laub O. Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J Virol* 1989; 63: 919-927
 88. **Honorati MC**, Dolzani P, Mariani E. Epitope specificity of Th₀/Th₂ CD4⁺ T-lymphocyte clones induced by vaccination with rHBsAg vaccine. *Gastroenterology* 1997; 112: 2017-2027
 89. **Hosono S**, Tai PC, Wang W, Ambrose M, Hwang DG, Yuan TT, Peng BH, Yang CS, Lee CS, Shih C. Core antigen mutations of human hepatitis B virus in hepatomas accumulate in MHC class II-restricted T cell epitopes. *Virology* 1995; 212: 151-162
 90. **Howard CR**, Karthigesu VD, Allison LMC, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC. Hepatitis B virus variants with altered a determinants causing infections in immunized children. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, (Hrsg.). *Viral hepatitis and liver disease*, Tokio; Springer 1994: 252-255

91. **Hu J**, Seeger C. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. PNAS 1996; 93: 1060-1064
92. **Hughes RR**. Post-penicilin jaundice. Brit Med J 1946; 1: 685-688
93. **Huovila APJ**, Eder AM, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-golgi compartment. J Cell Biol 1992; 118: 1305-1320
94. **Iwarson S**. Diverging policies for vaccination against hepatitis B. Arch Suppl 1992; 4: 142-146
95. **Iwarson S**, Jilg W, Stroffolini. Substantial decline of notified hepatitis B in Europe after 1985: Scan J Infect Dis 1994; 26: 19-22
96. **Jilg W**, Novel hepatitis B vaccines. Vaccine 1998; 16 Suppl.; S65-S68
97. **Jilg W**. Klinischer Leitfaden Virushepatitis. 1997
98. **Juarez-Figueroa L**, Uribe-Salas F, Conde-Glez C, Hernandez-Avila M, Olamendi-Portugal M, Uribe-Zuninga P, Calderon E. Low prevalence of hepatitis B markers among Mexican female sex workers. Sex Transm Infect 1998; 74: 448-450
99. **Jung MC**, Spengler U, Schraut W. Hepatitis B virus antigen-specific T cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. J Hepatol 1991; 13: 310-317
100. **Kaldor JM**, Plant AJ, Thompson SC, Longbottom H, Rowbottom J. The incidence of hepatitis B infection in Australia: an epidemiological review. Med J Aust 1996; 165: 322-326
101. **Kaneko S**, Miller RH. X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. J Virol 1988; 62: 3979-3984
102. **Kann M**, Bischof A, Gerlich WH. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. J Virol 1997; 71: 1310-1316
103. **Kann M**, Gerlich WH. Hepatitis B. In: Collier L, Barlows A, Sussman M (Hrsg.). Microbiology and microbial infections. Vol 1 Virology. London: Topley & Wilson 1998, 745-773
104. **Karpen S**, Banerjee R, Zelent A, Price P, Acs G. Identification of protein-binding sites in the hepatitis B virus enhancer and core promoter domains. Mol Cell Biol 1988; 8: 5159-5165
105. **Kekule AS**, Lauer U, Weiß L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. Nature 1993; 361: 742-745
106. **Köck J**, Schlicht HJ. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. J Virol 1993; 67: 4867-4874
107. **Koff RS**. Problem hepatitis viruses: the mutants. Am. J. Med. 1994; 96: 52S-56S
108. **Krone B**, Lenz A, Heermann KH, Seifer M, Lu X, Gerlich WH. Interaction between hepatitis B surface protein and monomeric human serum albumin. Hepatology 1990; 11: 1050-1056
109. **Kropshofer H**, Max H, Halder T, Kalbus M, Kalbacher H. Self-peptides from four HLA-DR alleles share hydrophobic anchor residues near the NH₂-terminal including proline as a stop signal for trimming. J Immunol 1993; 151: 4732-4742
110. **Krugman S**, Giles JP, Hammond J. Viral hepatitis type B (MS-2 strain): studies on active immunization. JAMA 1971; 217: 41-45
111. **Krugman S**, Giles JP. Viral hepatitis type B (MS-2 strain): further observations on natural history and prevention. N Eng J Med 1973; 288: 755-760
112. **Landers TA**, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. J Virol 1977; 23: 368-376
113. **Lanford RE**, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. PNAS 1998; 95: 5757-5761

114. **Larsen CE**, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, Alper CA. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 2000; 18: 3021-3030
115. **Lien JM**, Aldrich C, Mason W. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 1986; 57: 229-236
116. **Lien JM**, Petcu D, Aldrich C, Mason W. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol* 1987; 61: 3832-3840
117. **Livak KJ**, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362
118. **Loeb DD**, Hirsch RC, Ganem D. Sequence-independent RNA cleavage generate the primer for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implication for other reverse transcribing elements. *EMBO J* 1991; 10: 3533-3540
119. **Lürman**. Eine Ikterusepidemie. *Berl Klein Wochenschr* 1885; 22: 20-23
120. **Lyamichev V**, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 1993; 260: 778-783
121. **Lyons AS**. Ancient civilizations. In: Lyons AS, Petrucelli RJ (Hrsg.). *Medicine: an illustrated history*. New York; HN Abrams 1978: 57-149
122. **MacCallum FO**, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* 1944; ii: 228
123. **MacCallum FO**. Homologous seum jaundice. *Lancet* 1947; ii: 691-692
124. **Machida A**, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, Oda K. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 1984; 86: 910-918
125. **Magnius LO**, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
126. **Maguire H**, Hoeffler J, Siddiqui A, HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991; 252: 842-844
127. **Marion PL**, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *PNAS* 1980; 77: 2941-2945
128. **Marion PL**, Van Davelaar MJ, Knight SS, Saalszar FH, Garcia G, Popper H, Robinson WS. Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. *PNAS* 1986; 83: 4543-4546
129. **Mason WS**, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 1980; 36: 829-836
130. **Marquardt O**, Heerman KH, Seifer M, Gerlich WH. Cell-type dependent expression and secretion of hepatitis B virus pre-S1 surface antigen. *Postgrad Med J* 1987; 63 (Suppl 2), 41-50
131. **McAleer WJ**, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 1984; 307: 178-180
132. **McClary H**, Koch R, Chisari F, Guidotti L. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 2000; 74: 2255-2264
133. **McLachlan A**, Milich DR, Raney AK, Riggs MG, Hughes JL, Sorge J, Chisari FV. Expression of hepatitis B surface and core antigens: influence of preS and precore sequences. *J Virol* 1987; 61: 683-692

134. **McLean AA**, Hilleman MR, McAleer WJ. Summary of worldwide experience with HB-Vax. *J Infect.* 1983; 95 (Suppl 7) : 95-104
135. **McMahon G**, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dottavio D, Tolpin MD, Nadler PI, Ostberg L. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. *Hepatology* 1992; 15: 757-766
136. **Michel ML**, Pol S, Brechot C, Tiollais P. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti HBV vaccine: from present to future. *Vaccine* 2001; 19: 2395-2399
137. **Milich DR**, McLachlan A. The nucleocapsid of the hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science* 1986; 234: 1398-1401
138. **Milne A**, Allwood GK, Moyes CD, Pearce NE, Lucas CR. Prevalence of hepatitis B infections in a multiracial New Zealand community. *N Z Med J* 1985; 98: 529-532
139. **Min W**, Kamikawaji N, Mineta M, Tana T, Kashiwagi S, Sasazuki T. Identification of an epitope for T cells correlated with antibody response to hepatitis B surface antigen in vaccinated humans. *Hum Immunol* 1996; 46: 93-99
140. **Molnar-Kimber KL**, Summers J, Mason WS. Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcriptions. *J Virol* 1984; 51: 181-191
141. **Murakami S**. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001; 36: 651-660
142. **Nassal M**, Schaller H. Hepatitis B virus replication- un update. *J Viral Hepatitis* 1996; 3: 217-226
143. **Naumann H**, Schäfer S, Yosihida CFT, Gaspar AMC, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74: 1627-1632
144. **Nayersina R**, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut R., Person JL, Redeker AG, Chisari FV. HLA A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993; 150: 4659-4671
145. **Neurath AR**, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 1992; 175: 461-469
146. **Nomura T**, Lin Y, Dorjsuren D, Ohno S, Yamashita T, Murakami S. Human hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells and active for transactivation. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1453: 330-340
147. **Norder H**, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74: 1341-1348
148. **Norder H**, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
149. **Norder H**, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK, Magnius LO. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* 1996; 218: 214-223
150. **Ohnuma H**, Machida A, Okamoto H, Tsuda F, Sakamoto M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Allelic subtyping of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y or w/r. *J Virol* 1993; 67: 927-932
151. **Okochi K**, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 1968; 15: 374-385

152. **Ou J**, Yeh C, Yen TSB. Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide: J Virol 1989; 63: 5238-5243
153. **Palmovic D**, Crnjakovic-Palmovic J. Prevention of hepatitis B virus infection in health care workers after accidental exposure: A comparison of two prophylactic schedules. Infection 1993; 21: 42-45
154. **Panina-Borignon P**, Tan A, Demotz S, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. Eur J Immunol 1998; 19: 2237-2242
155. **Patterson F**, Burmak J, Batey R. Changing prevalence of hepatitis B virus in urbanized Australian aborigines. J Gastroenterol Hepatol 1993; 8: 410-413
156. **Pawlotsky JM**, Belec L, Gresenguet G, Deforges L, Bouvier M, Duval J, Dhumeaux D. High prevalence of hepatitis B, C and E markers in young sexually active adults from the Central African Republic. J Med Virol 1995; 46: 269-272
157. **Perez OM**, Morales W, Paniagua M, Strannegard O. Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 17-21
158. **Persing DH**, Varmus HE, Ganem D. The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. J Virol 1987; 61: 1672-1677
159. **Peterson DL**, Paul DA, Lam J, Tribby IIE, Achord DT. Antigenic structure of the hepatitis B surface antigen: identification of the d subtype determinant by chemical modifications and the use of monoclonal antibodies. J Immunol 1984; 132: 920-927
160. **Petit MA**, Dubanchet S, Capel F, Dauguet C, Hauser P. HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1 (21-47). Virology 1991; 180: 483-491
161. **Petit MA**, Mabit H, Duclo-Vallee C, Capel F. Putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV). Gastroenterol Clin Biol 1997; 21: 167
162. **Pontisso P**, Petit MA, Vankowski M, Peeples M. Human liver plasma membrane contains receptors for the hepatitis B virus preS1 region and via polymerized human serum albumine for the preS2 region. J Virol 1989; 63: 1981-1988
163. **Pontisso P**, Ruvoletto MG, De Falco S, Ruvo M, Cassani G, Gatta A, Alberti A, Fassina G. Native hepatitis B virus particles interact with the HBV-binding protein in transfected cells. Antiviral Therapy 2000; 5 (Suppl 1): 39
164. **Popper HM**, Shih JKW, Gerin JL, Wong DC, Hoyer BH, London WT, Sly DL, Purcell RH. Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations. Hepatology 1981; 1: 91-98
165. **Protzer-Knolle U**, Naumann U, Bartenschlager R, Berg T, Hopf U, Meyer zum Büschenfelde KH, Neuhaus P, Gerken G. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. Hepatology 1998; 27: 254-263
166. **Pult I**, Netter HJ, Fröhlich K, Kaleta EF, Will H. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. Virology 2001; 289: 114-128
167. **Radiziwill G**, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNaseH activity. J Virol 1990; 64: 613-620
168. **Rahman F**, Dahmen A, Herzog-Hauff S, Böcher WO, Galle PR, Löhr HF. Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen. Hepatology 2000; 31: 521-527
169. **Rall LB**, Standring DN, Laub O, Rutter WJ. Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. Mol Cell Biol 1983; 3: 1766-1773

-
170. **Rammensee HG**. Antigen presentation - recent developments. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 299-307
171. **Rammensee HG**. Chemistry of peptides associated with MHC class I and II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 85-96
172. **Raney AK**, Le HB, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 1992; 66: 6912-6921
173. **Rehermann B**, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation in cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J Clin Invest* 1995; 96: 1527-1534
174. **Robinson WS**, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 14: 384-391
175. **Sad S**, Mosmann TR. Single IL-2 secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 and Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol* 1994; 153: 3514-3522
176. **Sattler F**, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 1979; 32: 226-233
177. **Schaller H**, Fischer M. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression: *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 168: 21-39
178. **Schätzl HM**, Sieger E, Jilg W, Nitschko H, Zachoval R. Variability of the hepatitis B surface protein in HBV-infected liver transplant recipients. *J Biomed. Sci* 1997; 4: 146-154
179. **Scheibenbogen C**, Lee KH, Mayer S, Stevanovic S, Möbius U, Herr W, Rammensee HG, Keilholz U. A sensitive Elispot assay for the detection of CD8+ lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza protein in blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 221-226
180. **Scheibenbogen C**, Lee KH, Mayer S, Stevanovic S, Rammensee HG, Keilholz U. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN- γ Elispot assay. *Int J Cancer* 1997; 71: 932-936
181. **Schirmbeck R**, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Virol* 1994; 68: 1418-1425
182. **Schlicht HJ**, Schaller H. The secretory core protein of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface. *J Virol* 1989; 63: 5399-5404
183. **Schlicht HJ**, Wasenauer G. The quaternary structure, antigenicity and aggregational behaviour of the secretory core protein of human hepatitis B virus are determined by its signal sequence. *J Virol* 1991; 65: 6817-6825
184. **Schultz U**, Chisari F. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol* 1999; 73: 3162-3168
185. **Seefe LB**, Zimmermann HJ, Wright EL. A randomized controlled double blind trial of the efficacy of post transfusion hepatitis: A Veterans Administration cooperative study. *Gastroenterology* 1977; 72: 111-121
186. **Seeger C**, Baldwin B, Hornbuckle WE, Yeager AE, Tennant BC, Cote P, Ferrell L, Ganem D, Varmus HE. Woodchuck hepatitis virus is a more efficient oncogenic agent than ground squirrel hepatitis virus in a common host. *J Virol* 1991; 65: 1673-1679
187. **Seifer M**, Zhou S, Standring DN. A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol* 1993; 67: 249-257
188. **Shimbo S**, Zhang ZW, Gao WP, Hu ZH, Qu JB, Watanabe T, Nakatsuka H, Matsuda IN, Higashikawa K, Ikeda M. Prevalence of hepatitis B and C infection markers among adult women

- in urban and rural areas in Shaanxi Providence, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29: 263-268
189. **Sinigaglia F**, Guttinger M, Kilgus J, Doran DM, Matile H, Etlinger H, Trzeciak A, Gillessen D, Pink JRL. A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature* 1988; 336: 778-780
 190. **Sobotta D**, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH. Mapping of immunodominant B cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtypes. *J Gen. Virol* 2000; 81: 369-378
 191. **Stamouli M**, Gizaris V, Totos G, Papaevangelou G. Decline of hepatitis B infection in Greece. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 447-449
 192. **Steinman RM**. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1993; 271-296
 193. **Stern LJ**, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 1994; 2: 245-251
 194. **Stern LJ**, Brown JH, Jardetzky TS, Wiley DC. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994; 368: 215-221
 195. **Stevens CE**, Toy P, Tong MJ. Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States; prevention by passive-active immunization. *JAMA* 1985; 253: 1740-1745
 196. **Stevens CE**, Taylor PE; Tong MJ. Prevention of perinatal hepatitis B infection with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. In: Zuckerman AJ (Hrsg). *Viral hepatitis and liver disease*. New York, Liss AR, 1988: 982-988
 197. **Sturniolo T**, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Sinigaglia F, Hammer J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microassays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 555-561
 198. **Styver L**, De Gendt, van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Roussau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
 199. **Su Q**, Schroder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120
 200. **Summers J**, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *PNAS* 1975; 72: 4597-4601
 201. **Sureau C**, Lanford R. Analysis of hepatitis B virus envelope proteins in assembly and infectivity of human hepatitis delta virus. *Prog Clin Biol Res* 1993; 382: 45-51
 202. **Tai PC**, Banik D, Lin GI, Pai S, Pai K, Lin MH, Yuoh G, Che S, Hsu S, Chen TC, Kuo TT, Lee CS, Yang CS, Shih C. Novel and frequent mutations of hepatitis B virus coincide with a major histocompatibility complex class I-restricted T-cell epitope of the surface antigen. *J Virol* 1997; 71: 4852-4856
 203. **Takahashi H**, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 1990; 344: 873-875
 204. **Tanaka J**. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000; 18 Suppl 1: S17-S19
 205. **Testut P**, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Takaia F, Degott C, Blake J, Boyer B, Buendia MA. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 1996; 70: 4210-4219
 206. **Thung SN**, Gerber MA. Polyalbumin receptors: their role in the attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Semin Liver Dis* 1984; 4: 69-75

207. **Transy C**, Fourel G, Robinson WS, Tiollais P, Marion PL, Buendia MA. Frequent amplification of c-myc in ground squirrel liver tumors associated with past or ongoing infection with a hepadnavirus. *PNAS* 1992; 89: 3874-3878
208. **Treichel U**, Meyer zum Büschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into the liver cells. *Arch Virol* 1997; 142: 493-498
209. **Treinin M**, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 545-548
210. **Truant R**, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 1995; 69: 1851-1859
211. **Tsutsui H**, Mizoguchi Y, Morisawa E. There is no correlation between function and lymphokine production of anti-HBs specific human CD4⁺-cloned T cells. *Scand J Immunol* 1991; 34: 433-444
212. **Valenzuela P**, Gray P, Quiroga M, Zalvidar J, Gray P, Rutter WJ. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1979; 280: 815-819
213. **Valenzuela P**, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298: 347-350
214. **Vallee R**, Sheptner H. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 909-932
215. **Vardas E**, Mathai M, Blaauw D, McAnerney J, Coppin A, Sim J. Preimmunization epidemiology of hepatitis B virus infection in South Africa children. *J Med Virol* 1999; 58: 111-115
216. **Vaudin M**, Wolstenholme AJ, Tsiquaya KN, Zuckermann AJ, Harrison TJ. The complete nucleotide sequence of genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 1988; 69: 1383-1389
217. **Vingerhoets J**, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell response in non-responders to hepatitis B vaccination : absence of Th1 cytokine production. *Immunol Lett* 1994; 39: 163-168
218. **Wainwright RB**, McMahon BJ, Bender TR, Heyward WL, Nakanishi S, Wainwright KY, Foliaki S, Erickson SL, Fields HA. Prevalence of hepatitis B virus infection in Tonga: identifying high risk groups for immunization with hepatitis B vaccine. *Int J Epidemiol* 1986; 15: 567-571
219. **Wang X**, Forrester K, Yeh H, Feitelson M, Gu J, Harris C. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity and association with transcription factor ERCC3. *PNAS* 1994; 91: 2230-2234
220. **Warren KS**, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto K, Verschoor EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orantans. *J Virol* 1999; 73: 7860-7865
221. **Waters JA**, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas HC. Loss of the common a determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992; 90: 2543-2547
222. **Watts C**. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 26-31
223. **Weimer T**, Schödel F, Jung MC, Pape GR, Alberti A, Fattovich G, Beljaars H, Van Eerd PMC, Will H. Antibodies to the RNaseH domain of hepatitis B P protein are associated with ongoing viral replication. *J Virol* 1990; 64: 5665-5668
224. **Weinberger K**. Mutationen im Hepatitis B Virus Oberflächenantigen – epidemiologische Erfassung und Charakterisierung der Auswirkungen auf die diagnostische Erkennung und die humorale Immunität gegen das Hepatitis B Virus. 2000, Dissertation; Universität Regensburg
225. **West DJ**. Clinical experience with hepatitis B vaccines. *Am J Infect Contr* 1989; 17: 172-180

226. **West DJ**, Calandra GB, Hesely TM. Control of hepatitis B through routine immunization of infants: The need for flexible schedules and new combination vaccine formulations. *Vaccine* 1993; 11: S21-S27
227. **Will H**, Cattaneo R, Darai G, Deinhardt F, Schellekens H, Schaller H. Infectious hepatitis B virus from cloned DNA of known nucleotide sequence. *PNAS* 1985; 82: 891-895
228. **Will H**, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 904-911
229. **Wilson JN**, Nokes DJ, Carman WF. The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: a cause for concern? *Vaccine* 1999; 7: 973-978
230. **Wilson JN**, Nokes DJ, Carman WF. Current status of HBV vaccine escape variants. A mathematical model of their epidemiology. *J Viral Hep* 1998; 5 (Suppl 2): 25-30
231. **Wu L**, He JW, Yoa X, Li HM, Wen YM. A novel hepatitis B virus variant S129: lack of correlation between antigenicity and immunogenicity. *J Med Virol* 1999; 59: 424-430
232. **Xu ZY**, Liu CB, Francis DP. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine. *Pediatrics* 1985; 76: 713-718
233. **Yaginuma K**, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *PNAS* 1987; 84: 2678-2682
234. **Yeh CT**, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core protein contains a signal for nuclear transport. *J Virol* 1990; 64: 6141-6147
235. **Young MD**, Rosenthal MH, Dickson B, Du W, Maddrey WC. A multi-center controlled study of rapid hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine. *Vaccine* 2001; 19: 3437-3443
236. **Zhou S**, Yang SQ, Stanring DN. Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *J Virol* 1992; 66: 3086-3092
237. **Zoulim F**, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994a; 68: 2026-2030
238. **Zoulim F**, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* 1994b; 68: 6-13

6. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Im *Système international* enthaltene Einheiten physikalischer Größen und die zugehörigen Präfixe werden nicht genannt. Ebenso vorausgesetzt werden die Symbole chemischer Elemente, sowie die natürlich vorkommenden Aminosäuren und Nukleotide.

Ak	Antikörper
Anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-Kapsid-Antigen
Anti-HBe	Antikörper gegen das frühe, lösliche Hepatitis B-Virus-Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
AS	Aminosäure(n)
AuAg	Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>Australia antigen</i>)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cccDNA	kovalent geschlossene, zirkuläre Form der DNA (<i>covalently closed circular DNA</i>)
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cpm	Einheiten pro minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T cells</i>)
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DMEM	Medium für die eukaryotische Zellkultur (<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DR	direkte Sequenzwiederholung (<i>direct repeat</i>)
ds	doppelsträngig
Elispot	<i>enzyme-linked immunospot-assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
gp	Glykoprotein
HB	Hepatitis B
HBcAg	Hepatitis B Virus-Kapsid-Antigen (<i>hepatitis B core antigen</i>)
HBeAg	Frühes, lösliches Hepatitis B-Virus-Antigen (<i>hepatitis B virus early antigen</i>)
HBpol	Hepatitis B-Virus-Polymerase
HBsAg	Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>hepatitis B surface antigen</i>)
HBV	Hepatitis B Virus
HBxAg	Hepatitis B-Virus-x-Antigen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheiten (<i>international units</i>)
kD	kiloDalton
IHBsAg	großes Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>large hepatitis B virus surface antigen</i>)

MEM	Minimalmedium für die eukaryotische Zellkultur (<i>minimal essential medium</i>)
mHBsAg	mittleres Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>middle hepatitis B virus surface antigen</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NBT/BCIP	4-Nitro-blau-tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
nt	Nukleotide
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pgRNA	prägenomische RNA
PHA	Phytohämagglutinin
PHH	primäre humane Hepatozyten
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SI	Stimulationsindex
sHBsAg	kleines Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>small hepatitis B virus surface antigen</i>)
S/N	Signal-Hintergrundverhältnis (<i>signal to noise ratio</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
Th	T-Helferzelle
TP	terminales Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (Unit)
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
w/v	Massenprozent (<i>weight per volume</i>)

Veröffentlichte Arbeiten

Publikationen

1. Weinberger KM, Zoulek G, **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 1999; 58: 105-110
2. Weinberger KM, **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol* 2000; 81: 1165-1174
3. Weinberger KM, Zoulek G, **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen. *Hepatitis Rev J*; im Druck
4. Weinberger KM, Prohaska E, **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. Biophysical analysis of the interaction of hepatitis B virus surface antigen with specific antibodies using a quartz-crystal microbalance. In: Margolis H. (Hrsg.). *Viral hepatitis and liver disease*; im Druck
5. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology* 2002; 35: 455-465

Präsentationen

Vorträge

1. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. A naturally occurring mutation in an immunogenic T cell epitope within the hepatitis B surface antigen leads to complete loss of specific T helper cell reactivity. VIth International Conference on current trends in chronically evolving Viral Hepatitis; Hannover, 1999
2. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. A naturally occurring mutation in an immunogenic T cell epitope within the hepatitis B surface antigen leads to complete loss of specific T helper cell reactivity. XXX. Tagung der Gesellschaft für Immunologie; Hannover, 1999
3. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Application of the enzyme-linked immunospot- (Elispot) assay for the quantification of Hepatitis B virus reactive T cells after HBV vaccination. 11th International congress for Immunology; Stockholm, 2001
4. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Variants of immunodominant T cell epitopes derived from the hepatitis B surface antigen lead to loss of specific T and B cell response of vaccinated individuals. International meeting on hepatitis B viruses; Amherst, 2001
5. **Bauer T**, Tausch U, Weinberger K, Thasler W, Jauch KW, Jilg W. Influence of TH1-type cytokines on *in vitro* hepatitis B virus infection of long-term cultures of primary human hepatocytes. VIIth International Conference on current trends in chronically evolving Viral Hepatitis; Florenz, 2001

Posterbeiträge

1. **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. Eine Mutation innerhalb eines immunogenen Epitops des Hepatitis B-Oberflächenantigens führt zu verminderter T-Zell-Reaktivität. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie; Bremen, 1999
2. **Bauer T**, Böhm S, Jilg W. Natürlich vorkommende Mutationen in einem T-Zellepitop des Hepatitis B-Oberflächenantigens führen zu verminderter T-Helferzell-Reaktivität. 16. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL); Köln, 2000
3. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Natürlich vorkommende Varianten von T-Zellepitopen des Hepatitis B-Oberflächenantigens führen zu verminderter T-Helferzell-Reaktivität. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie; Wien, 2000

4. **Bauer T**, Böhm S, Weinberger K, Jilg W. Naturally occurring mutations in immunogenic T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen lead to complete loss of specific T helper cell reactivity. Xth International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Atlanta, 2000
5. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Naturally occurring variants of immunogenic T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen (HBsAg) lead to loss of specific T and B cell response. European Virology; Glasgow, 2000
6. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Identifizierung von Varianten immundominanter T-Helferzell-Epitope innerhalb des Hepatitis B-Oberflächenantigens, die die impfinduzierte zelluläre Immunantwort unterlaufen. 17. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL); Aachen, 2001
7. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. *Enzyme-linked immunospot-assay* (Elispot) zur Quantifizierung der impfinduzierten zellulären Immunantwort nach Hepatitis B-Grundimmunisierung. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie; Dresden, 2001
8. **Bauer T**, Weinberger K, Jilg W. Application of the enzyme-linked immunospot-assay (Elispot) for the quantification of Hepatitis B virus reactive T cells after HBV vaccination. 11th International congress for Immunology; Stockholm, 2001
9. **Bauer T**, Tausch U, Weinberger K, Thasler W, Jauch KW, Jilg W. Influence of TH1-type cytokines on *in vitro* hepatitis B virus infection of long-term cultures of primary human hepatocytes. 18. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL); Leipzig, 2002

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank **Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg** unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, für die Betreuung der Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Im besonderen Maß möchte ich mich bedanken, daß er mir von Beginn an die Möglichkeit gab meine Daten auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Vertretung der vorliegenden Arbeit vor der naturwissenschaftlichen Fakultät III.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jilg sei gedankt für die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei meiner früheren Kollegin **Gerlinde Benninger-Döhring** bedanken, die mir zu Beginn meiner „immunologischen Forschung“ zur Seite stand und durch so manche Diskussion meiner Arbeit neue Impulse gab.

Desweiteren ein herzliches Dankeschön an:

Die Mitarbeiter der virologischen Abteilung insbesondere an **Frau Barbara Hottenträger**, die aufgrund ihres immensen Erfahrungsreichtums aber vor allem aufgrund ihrer Herzlichkeit oft zu Rate gezogen wurde.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe Dobner, speziell, **Barbara Härtl, Tanja Lucas, André Rusch, Birgitt Täuber** und **Thomas Zeller**. Als „Adoptiv-Arbeitsgruppenmitglied“ fand ich bei ihnen immer offene Ohren für kleinere und größere Probleme.

Ludwig Deml für viele hilfreiche Diskussionen und die Bereitschaft Manuskripte kritisch zu begutachten.

Frau **Astrid Brunner** für die Herstellung und Reinigung unzähliger Peptide.

Meine Freunde und frühere Kollegen aus der Bakteriologie, die stets regen Anteil am Fortgang meiner Arbeit nahmen. Desweiteren an alle übrigen nicht namentlich genannten Kollegen/innen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, die mich im Laufe der Jahre begleitet haben.

Last but not least, möchte ich mich auch bei all den freiwilligen Blutspendern bedanken. Ohne ihre Kooperation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Tanja Bauer